



Università di Pisa

Dipartimento di biologia

**Corso di laurea magistrale in Biotecnologie
Molecolari e Industriali**

Tesi di Laurea

***“Neuro-protezione come trattamento terapeutico per
la prevenzione della Retinopatia Diabetica”***

Candidata:

Domenica Napoli

Relatore:

Prof. Massimo Dal Monte

Anno Accademico: 2014/2015

INDICE

RIASSUNTO

1.INTRODUZIONE

- 1.1. IL SENSO DELLA VISTA: ANATOMIA E FISIOLOGIA
 - 1.1.1. *Anatomia dell'occhio*
 - 1.1.2. *Struttura della retina*
 - 1.1.2.1. Componente vascolare
 - 1.1.3. *Fisiologia della retina*
- 1.2. RETINOPATIA DIABETICA
 - 1.2.1. *Una visione d'insieme*
 - 1.2.2. *Come l'iperglicemia crea stress nella retina*
 - 1.2.3. *Vasculopatia e Angiogenesi*
 - 1.2.4. *Non solo vasculopatia: Neurodegenerazione*
 - 1.2.5. *Interazione neurovascolare*
 - 1.2.6. *Possibilità di prevenire la DR : neuroprotezione*
 - 1.2.6.1. Trattamenti terapeutici applicati oggi
 - 1.2.6.2. Strategia neuroprotettiva
- 1.3. MODELLO SPERIMENTALE
 - 1.3.1. *Modello in vivo*
 - 1.3.2. *Modelli in vitro*
 - 1.3.3. *Modelli ex-vivo*

2.SCOPO DELLA TESI

3.MATERIALI E METODI

- 3.1. ANIMALI ED ESPIANTI DI RETINA
- 3.2. COLTURE ORGANOTIPICHE EX-VIVO
- 3.3. TRATTAMENTI NEUROPROTETTIVI
- 3.4. PREPARAZIONE DELLE SEZIONI RETINICHE
- 3.5. COLORAZIONE CON DAPI
- 3.6. IMMUNOISTOCIMICA
- 3.7. ANALISI D'IMMAGINE
- 3.8. REAL-TIME RT-PCR
- 3.9. WESTERN BLOT
- 3.10. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)
- 3.11. STATISTICA
 - 3.11.1. PREPARAZIONE DELLE FIGURE

4.RISULTATI

- 4.1. CARATTERIZZAZIONE DEL MODELLO SPERIMENTALE: APOPTOSI ED ESPRESSIONE/RILASCIO DI VEGF

4.1.1. *Modello HG*

4.1.1.1. Indagine di immunoistochimica per l'analisi dei livelli di espressione della caspasi-3-attiva

4.1.1.2. Livelli di apoptosi e rilascio di VEGF

4.1.2. *Modello OS*

4.1.2.1. Analisi dei livelli di caspasi-3-attiva su espianti retinici immunomarcanti

4.1.2.2. Apoptosi nei vasi retinici: doppia marcatura caspasi 3 attiva-CD31

4.1.2.3. Quantificazione dei livelli di citocromo c relativi e confronto con i livelli di mRNA del VEGF

4.1.2.4. Rilascio del VEGF

4.1.3. *Modello AGE*

4.1.3.1. Analisi dei livelli di caspasi-3-attiva su sezioni retiniche immunomarcate

4.1.3.2. Quantificazione apoptotica

4.1.3.3. Rilascio di VEGF nel mezzo di coltura

4.2. STRATEGIA NEUROPROTETTIVA

4.2.1. *Modello "HG"*

4.2.1.1. Analisi dei livelli di mRNA della caspasi-3-attiva e di VEGF in espianti retinici trattati con OCT e PACAP

4.2.1.2. Rilascio di VEGF nel mezzo di coltura

4.2.1.3. Quantificazione dei livelli di mRNA di caspasi-3-attiva in presenza di VEGF-trap

4.2.2. *Modello OS*

4.2.2.1. Analisi dei livelli di mRNA della caspasi-3-attiva e del VEGF in espianti retinici trattati con OCT e PACAP

4.2.2.2. Rilascio di VEGF nel mezzo di coltura

4.2.2.3. Misura dei livelli di citocromo c in presenza di VEGF-trap

4.2.3. *Modello AGE*

4.2.3.1. Analisi dei livelli di mRNA della caspasi-3-attiva e del VEGF di espianti trattati con OCT e PACAP

4.2.3.2. Rilascio di VEGF nel mezzo di coltura

5. DISCUSSIONE

5.1. CARATTERIZZAZIONE DEL MODELLO SPERIMENTALE: APOPTOSI ED ESPRESSIONE/RILASCIO DI VEGF

5.1.1. *Apoptosi*

5.1.1.1. Modello HG

5.1.1.2. Modello OS

5.1.1.3. Modello AGE

5.1.2. *Alterazione del metabolismo del VEGF*

5.1.3. *Correlazione tra apoptosi e produzione/rilascio di VEGF*

5.2. STRATEGIA NEUROPROTETTIVA

5.2.1. *OCT e PACAP riducono apoptosi ed espressione/rilascio di VEGF*

5.2.2. *Effetti del VEGF-trap*

6.CONCLUSIONI

7.BIBLIOGRAFIA

Abbreviazioni

AGE	Prodotti avanzati di glicazione
BDNF	Fattore neurotrofico cerebrale
BRB	Barriera emato-retinica
DAG	Diacilglicerolo
DAPI	4'-6-diamidino-2-phenylindole
DME	Edema maculare diabetico
DO	Densità ottica
DR	Retinopatia diabetica
ERG	Elettroretinogramma
ET-1	Endotelina 1
FGF	Fattore di crescita dei fibroblasti
GCL	Strato delle cellule ganglionari
GLUT-1	Trasportatore per il glucosio 1
GFAP	Proteina gliale fibrillare acida
GS	Glutamina sintetasi
GSH	Glutathione
HIF-1α	Fattore inducibile dall'ipossia 1 α
IGF-1	Fattore di crescita insulina-simile 1
IRS-2	Substrato del recettore dell'insulina 2
INL	Strato nucleare interno
IPL	Strato plessiforme interno
NGF	Fattore di crescita nervoso
NPY	Neuropeptide Y
NO	Ossido nitrico
NPDR	Retinopatia diabetica non proliferativa
OCT	Octreotide
OD	Densità ottica
OIR	Retinopatia indotta dall'ossigeno
ONL	Strato nucleare esterno
OPL	Strato plessiforme esterno
PACAP	Peptide attivatore dell'adenilato ciclastasi della ghiandola pituitaria
PB	Tampone fosfato
PBS	Tampone fosfato salino
PDGR	Fattore di crescita derivato dalle piastrine
PDR	Retinopatia diabetica proliferativa
PK	Piruvato chinasi
PKC	Proteina chinasi C
RAAS	Sistema renina angiotensina aldosterone
RGC	Cellule ganglionari della retina
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
RPE	Epitelio pigmentato della retina
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SEM	Errore standard della media
SNC	Sistema nervoso centrale
SST	Somatostatina

STZ	<i>Streptozotocina</i>
TNFα	<i>Fattore di necrosi tumorale α</i>
VEGF	<i>Fattore di crescita endoteliale vascolare</i>
VEGFR1-2	<i>Recettore del VEGF di tipo 1 o 2</i>

Riassunto

La retinopatia diabetica (DR) è una patologia della retina di tipo infiammatorio caratterizzata dalla neo-vascolarizzazione della macula per angiogenesi. Si distinguono due forme di DR, una forma precoce in cui non vi è neoangiogenesi e una forma più tardiva detta *proliferativa*, perché marcatamente caratterizzata dalla proliferazione di nuovi vasi sanguigni. Le cause di questa patologia sono derivanti dall'alterazione del metabolismo del glucosio. Il diabete, infatti, è responsabile dell'iperglicemia cronica che attiva una serie di vie metaboliche che producono metaboliti tossici, i quali si accumulano nel sangue determinando danni in diversi tessuti dell'organismo, tra cui la retina. La retina subisce un danno che con il tempo, in assenza di interventi terapeutici efficaci, può portare alla cecità. La DR si sviluppa nel 75% dei pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1 e nel 50% dei pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2, indicando come all'aumentare del tempo di persistenza di alti livelli di glucosio nel sangue aumenta la predisposizione allo sviluppo della patologia. Sin dall'inizio l'attenzione è stata focalizzata sulla proliferazione dei vasi sanguigni, sull'aumento della permeabilità vascolare, sulla leucostasi e quindi per molto tempo la DR è stata considerata una malattia microvascolare. Intorno al 1998 furono pubblicati i primi lavori che dimostrarono l'esistenza del danno nella neuroretina e che questo danno precede il danno vascolare. Nello sviluppo della patologia si ha una lenta e graduale perdita di cellule ganglionari e amacrine e rilascio di fattori di crescita pro-angiogenici come VEGF (fattore di crescita endoteliale vascolare) insieme a fattori pro-infiammatori. Ciò suggerisce una correlazione tra degenerazione neuronale e vasculopatia, indice della sofferenza delle cellule retiniche. Tale sofferenza si manifesta quindi come risposta adattativa delle cellule della retina alla perturbazione del sistema derivante dall'iperglicemia.

Lo scopo della tesi è stato quello di dimostrare che se la fase precoce della DR è caratterizzata da una sofferenza neuronale cui consegue il rilascio di fattori pro-angiogenici, questi possono essere prevenuti effettuando un trattamento neuroprotettivo. A tale scopo il modello sperimentale è stato trattato con possibili molecole neuroprotettive, focalizzando l'attenzione verso i neuropeptidi rilasciati fisiologicamente dalle cellule della retina. Il modello sperimentale usato consiste in colture organotipiche di retina espantata da topi sani in cui sono state riprodotte le condizioni stressanti che si manifestano nella retinopatia diabetica, come l'HG, lo OS e la presenza di prodotti avanzati della glicazione (AGE). La scomposizione delle diverse componenti stressanti che contribuiscono alla patogenesi di questa malattia permette di individuare in quale processo

l'eventuale molecola neuroprotettiva agisce. La correlazione tra apoptosi ed espressione/rilascio di VEGF permette di confermare l'ipotesi che esiste una correlazione tra neurodegenerazione e vasculopatia e il VEGF sembra essere la molecola che lega queste due componenti patologiche. Questa correlazione è stata verificata con l'uso di octreotide (analogo sintetico della somatostatina) e di PACAP, due neuropeptidi liberati da varie popolazioni di cellule retiniche, valutando il loro effetto sul danno neuronale e espressione/rilascio di VEGF. I trattamenti fatti con i neuropeptidi riducono l'apoptosi a carico dei neuroni retinici così come il rilascio di VEGF. Ciò suggerisce la possibilità che trattamenti terapeutici effettuati nelle fasi precoci della DR con sostanze ad azione neuroprotettiva possano essere applicati nella prevenzione della DR, in quanto la riduzione del danno neuronale dovrebbe prevenire il danno vascolare indotto da agenti pro-angiogenici mediante la riduzione della produzione di VEGF.

1. Introduzione

1.1. Il senso della vista: anatomia e fisiologia

1.1.1. Anatomia dell'occhio

L'occhio è l'organo del senso più meraviglioso di cui un essere vivente può essere munito, è grazie agli occhi che il senso della vista permette all'organismo di vedere immagini colorate, capaci di far sentire all'essere vivente emozioni, sensazioni e più praticamente di muoversi e agire nell'ambiente in cui vive, con facilità. La perdita della vista è per questa sua straordinaria capacità, sempre un drammatico evento negli esseri viventi, tanto più nell'uomo che interagisce nell'ambiente sociale facendo molto riferimento al senso della vista.

L'occhio è l'organo del senso della vista (*Figura 1*). È costituito da un'apertura nera, la pupilla, attraverso cui entra la luce, è formata da tessuti che assorbono l'energia luminosa e questo giustifica la sua pigmentazione scura; intorno alla pupilla è presente un muscolo circolare che regola la dimensione della sua apertura in funzione della quantità di luce entrante. Si tratta dell'iride, che ha una colorazione variabile nei soggetti, dal marrone all'azzurro in base al rapporto dell'eumelanina (marrone/nero) e della feomelanina (rosso/giallo), prodotti dai melanociti. Pupilla e iride sono ricoperti da una membrana esterna trasparente, la cornea. Essa è la prima lente del sistema ottico, seguita dal cristallino che produce un'immagine nitida a livello dei fotorecettori. La cornea continua posteriormente con la sclera, di colore bianco, la quale dà forma e sostegno al bulbo ottico. È di rilevanza importante il fatto che la sclera è in continuità con la dura del sistema nervoso centrale (SNC), ha infatti un'apertura posteriore da cui fuoriesce il nervo ottico; vedremo che la relazione con il SNC è stretta, il tessuto più importante per la visione è infatti un tessuto del SNC.

In sezione trasversale notiamo nell'occhio tre diversi strati:

- Strato esterno, detto tonaca fibrosa, formato da cornea e sclera;
- Strato intermedio, diviso in una parte anteriore in cui troviamo corpo ciliare e iride e in una parte posteriore in cui è presente la coroide, questo è detto tonaca vascolare;
- Strato interno, detto tonaca nervosa, rappresentato dalla retina.

Inoltre si distinguono due camere, una camera anteriore e una camera posteriore (posta tra iride e apparato sospensore); in entrambe queste camere è presente l'umor acqueo; mentre dietro al cristallino si trova una sostanza molto gelatinosa, detta umor vitreo.

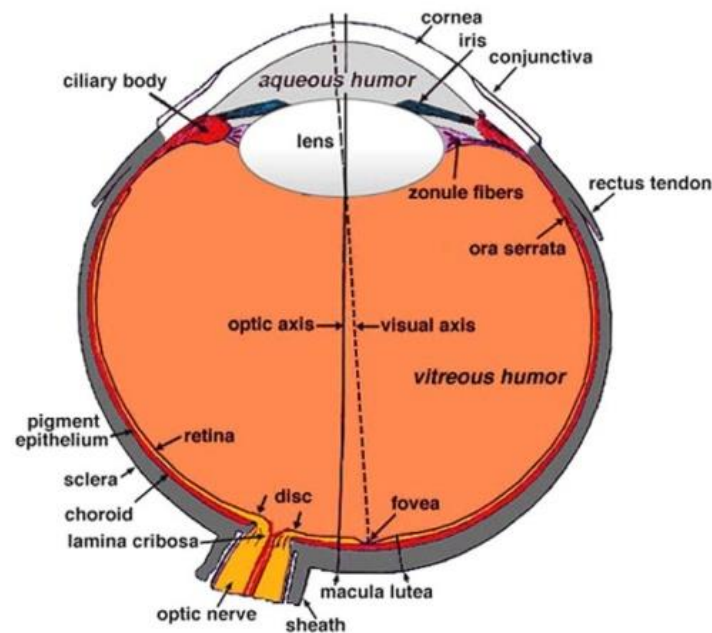


Figura 1 Sezione sagittale dell'occhio. Tratto da webvision.

1.1.2. Struttura della retina

Lo strato interno dell'occhio, come visto, è detto tunica nervosa, in quanto è formato dalla retina che è una componente specializzata del SNC. Essa è uno strato trasparente delimitato esternamente dall'epitelio pigmentato della retina (RPE), attraverso cui è coesa alla coppa ottica ed internamente dal corpo vitreo (David A. Antonetti, 2006). La retina, in quanto parte del SNC, mantiene come quest'ultimo una struttura stratificata ben organizzata, in cui si distinguono tre foglietti sovrapposti, interconnessi da neuroni e da due strati di sinapsi. La connessione con il cervello si realizza mediante il nervo ottico che entra ed esce dalla retina grazie al forame oculare, posto nel fondo dell'occhio. Nella retina coesistono, con una coordinazione armonica, diverse popolazioni cellulari, ma si distinguono essenzialmente tre grandi gruppi, cellule epiteliali, cellule nervose e cellule gliali. I neuroni sono responsabili dell'attività elettrica del tessuto e ritroviamo neuroni sensoriali di primo ordine, detti fotorecettori, cellule bipolari, cellule orizzontali, cellule amacrine e cellule ganglionari, questi sono neuroni di secondo e terzo ordine (David A. Antonetti, 2006) (Fig.2). La componente gliale caratteristica della retina è rappresentata maggiormente dalle cellule di Muller e da una popolazione di astrociti; questi tipi cellulari che sostengono meccanicamente e metabolicamente i neuroni retinici, sono confinati al rivestimento degli assoni

che si apprestano a formare il nervo ottico e ai vasi che entrano nella retina con il nervo ottico. Cellule di Muller e astrociti danno supporto meccanico ai neuroni, permettono la formazione della barriera ematoretinica (BRB) e il suo mantenimento; inoltre le cellule di Muller metabolizzano il glucosio e cedono direttamente il lattato alle cellule ganglionari (CGR), garantendo anche l'uptake del glutammato secreto dai neuroni per la neurotrasmissione. Invece, le cellule epiteliali, come descriveremo a seguire, costituiscono la rete vascolare della retina.

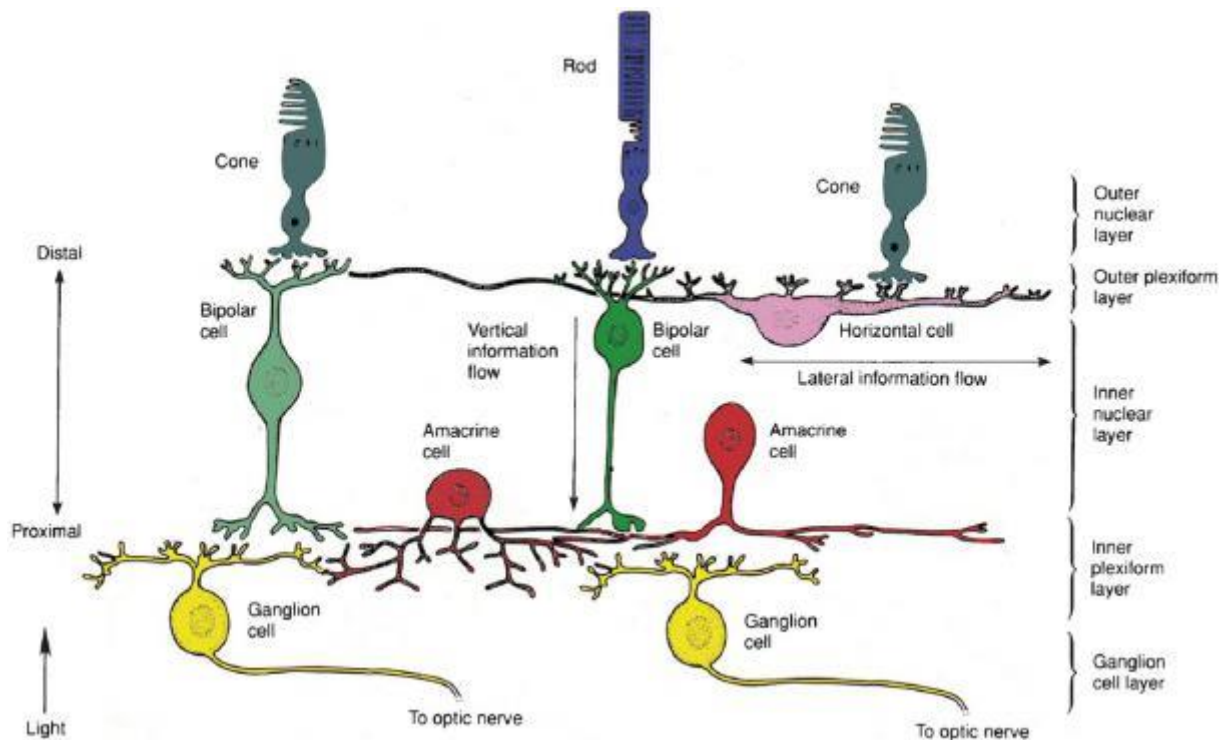


Figura 2 Tipi neuronali retinici. Tratto da Cervia et. al 2008

Gli strati retinici sono (Fig.3) :

- ONL (strato nucleare esterno), costituito dai fotorecettori; si distinguono in bastoncelli e coni e le membrane citoplasmatiche sono immerse nell'RPE;
- INL (strato nucleare interno), costituito dai soma dei neuroni sensoriali di secondo ordine, ovvero cellule bipolari e orizzontali, da cellule della glia retinica, quindi cellule di Muller e cellule amacrine;
- GCL (strato delle cellule ganglionari), costituito dai corpi cellulari delle cellule ganglionari e delle amacrine spiazzate;

Oltre ai tre strati cellulari descritti, ci sono due strati costituiti da sinapsi:

- OPL (strato plessiforme esterno), posto tra l'ONL e l'INL; contiene gli assoni derivanti dall'ONL e i dendriti derivanti dall'INL;

- IPL (strato plessiforme interno), posto tra INL e GCL e contenente gli assoni provenienti dall'INL e i dendriti provenienti dal GCL;

Gli assoni delle CGR formano le fibre del nervo ottico che fuoriesce dall'occhio a livello del disco ottico e arriva nelle zone della corteccia visiva del cervello, dove il segnale proveniente dall'occhio è processato in risposta visiva.

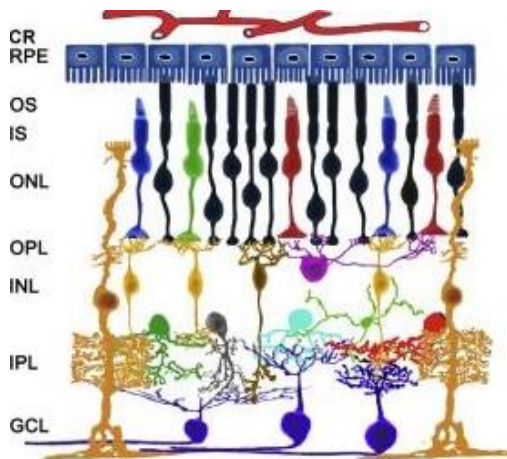


Figura 3 Schematizzazione degli strati della retina. Tratto da Cuenca et. al 2014.

1.1.2.1. Componente vascolare

Come il cervello, la retina è irrorata da sangue attraverso due letti vascolari differenti, la circolazione coroidale e la circolazione retinica e probabilmente riceve approvvigionamento anche dai corpi ciliari con diffusione attraverso il corpo vitreo (David A. Antonetti, 2006) (Fig.4); i coriocapillari supportano l'irrorazione sanguigna di ONL e OPL indirettamente e il letto vascolare che è formato dai capillari derivanti dall'arteria centrale retinica (CRA), sono responsabili della vascolarizzazione dell'INL, GCL e dell'IPL (Neville N. Osborne*, 2004). I coriocapillari corrispondono ai vasi della pia-aracnoide e sono gli stessi che approvvigionano il cervello di sangue. Questi sono capillari fenestrati facenti parte della coroide, separata dalla retina dall'RPE e dalla membrana di Brunch, per cui è chiaro che la retina esterna (ONL e OPL) è avascolare e riceve indirettamente O₂ (ossigeno) e metaboliti. Mentre CRA si origina dall'arteria oftalmica, a livello del forame ottico, ed è in stretta associazione con la vena retinica (Neville N. Osborne*, 2004); i capillari che si originano dalla CRA si estendono in superficie e arborizzano, vascolarizzando la retina interna (INL, IPL e GCL) con un letto intermedio e uno profondo.

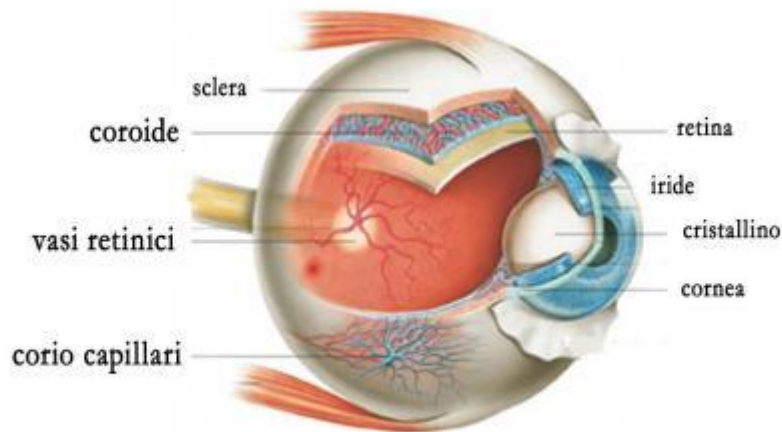


Figura 4 Schematizzazione della vascolarizzazione retinica. Tratto da medicalanatomy.com

Da questa breve descrizione si deduce che c'è una stretta relazione tra componente vascolare e componente neuronale, questo permette che l'approvvigionamento di O_2 e metaboliti sia sempre adeguato alla necessità dell'attività retinica. Inoltre la fenestrazione dei capillari è responsabile della formazione della barriera ematoretinica e ciò permette di controllare il flusso ionico e acquoso e di regolare l'influsso di proteine plasmatiche per i processi infiammatori. Esiste una relazione intima tra componente vascolare e nervosa che esplica l'importante funzione del mantenimento dell'omeostasi retinica che nel momento in cui viene a mancare altera la funzionalità del tessuto. (Fig.5).

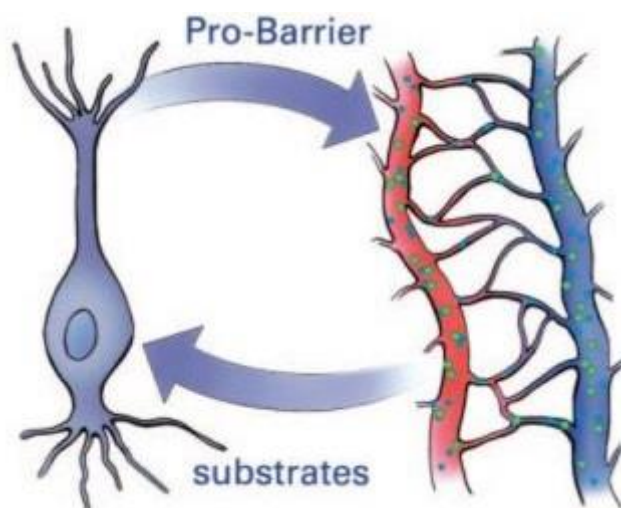


Figura 5 Apporto di nutrimento e ossigeno e rimozione dei metaboliti di scarto dei neuroni ad opera della barriera ematoretinica. Tratto da Antonietti et. al 2006.

1.1.3. Fisiologia della retina

La funzione principale della retina è la fototrasduzione in cui l'energia fotochimica è processata in energia elettrica, ovvero segnale visivo neuronale, per essere inviato a seguito dell'integrazione dei risultanti potenziali d'azione, attraverso le fibre del nervo ottico, alle zone corticali del lobo occipitale del cervello, in cui si origina la risposta che è l'immagine (David A. Antonetti, 2006). La retina è capace di fototrasdurre sia in condizioni di luce e sia in condizioni di quasi buio. La macula, grazie al fatto che ha l'assottigliamento del GCL e il maggior numero di fotorecettori, è la zona della retina che è capace della massima acuità, ovvero è la zona in cui avviene la massima discriminazione cromatica e il maggior contrasto degli oggetti (David A. Antonetti, 2006). Il centro della macula è detta fovea, responsabile della messa a fuoco; qui sono presenti solo coni e si realizza la più alta risoluzione dell'immagine. (FIG.6) I fotoni sono catturati dai fotorecettori e la risultante energia fotochimica è ceduta alle cellule bipolari che facendo sinapsi sia con i neuroni sensoriali di primo ordine e sia con i neuroni sensoriali di terzo ordine, trasmettono il segnale elettrico risultante alle CGR che grazie ai loro lunghi assoni formanti il nervo ottico, conducono il segnale elettrico fino alla corteccia visiva, passando per il chiasma ottico. In questa via di trasmissione del segnale visivo, sono partecipi neurotrasmettitori come il glutammato; questa appena descritta è la circuiteria verticale della retina a cui si aggiunge una neuromodulazione orizzontale in cui agiscono cellule amacrine e cellule orizzontali.

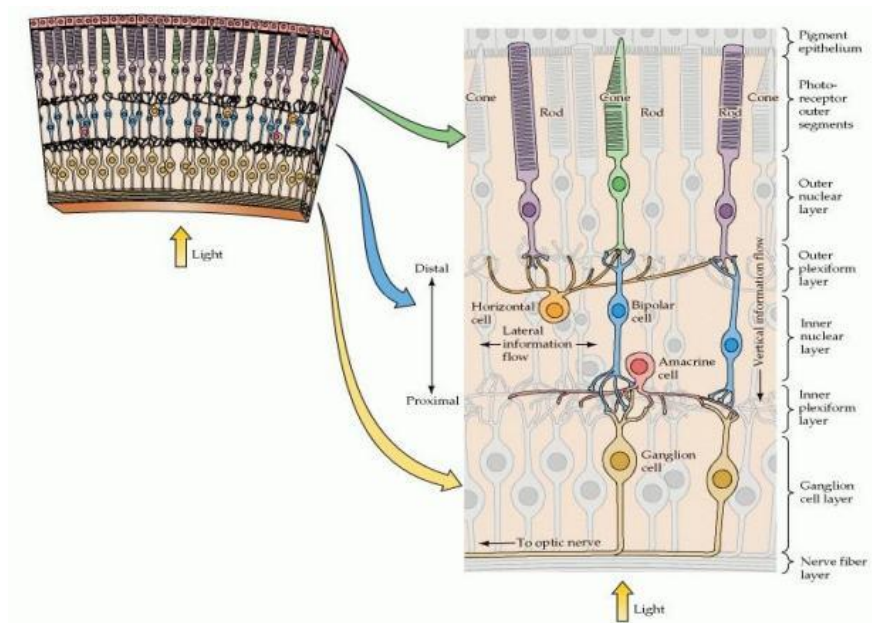


Figura 6 Ciruiteria dell'attività retinica. Tratto da Purves et al. 2001.

1.2. Retinopatia diabetica

La retina è un tessuto vulnerabile a perturbazioni, le patologie che la colpiscono sono dette retinopatie e una classe è rappresentata dalle retinopatie proliferative. In questo lavoro sperimentale di tesi, particolare attenzione è data a una classe di retinopatia proliferativa: la retinopatia diabetica.

1.2.1. Una visione d'insieme

La retinopatia diabetica DR è uno dei maggior problemi di salute che oggi affligge la popolazione, colpendo oltre 135 milioni di milioni di persone in tutto il mondo (FONG, 2004), provoca alterazione della vista fino alla cecità nel 5% dei pazienti (Alistair J. Barber *. E., 1998; Krisztina Szabadfi E. P., 2014); si tratta di una malattia che si sviluppa nei pazienti diabetici, esiste infatti una relazione lineare tra diabete e sviluppo di DR. Considerando che il diabete è una malattia che colpisce per lo più i paesi a più alto reddito mondiale, la DR sta diventando un'emergenza nei paesi più ricchi, ma alcuni studi dimostrano che sta diventando un problema emergente anche in Asia (Cheung N, 2010). Il diabete è una malattia metabolica caratterizzata da un disordine del metabolismo del glucosio che porta ad elevati livelli glicemici nel sangue. Esistono due tipi differenti di diabete, tipo 1 e tipo 2, del tipo 1 si tratta di una malattia autoimmune in cui vengono distrutte le cellule pancreatiche β , produttrici di insulina; questo tipo di diabete compare già in giovane età e perdura per tutta la vita. Nel tipo 2 si sviluppa con l'avanzare dell'età resistenza all'insulina o intolleranza al glucosio, per cui il risultato è sempre la non assimilazione del glucosio da parte delle cellule e quindi l'instaurarsi di una condizione iperglicemica. Tale condizione crea danno in molti distretti cellulari e soprattutto porta a disfunzioni del sistema vascolare da cui come conseguenza più grave si ha lo sviluppo della DR, oltre che disfunzioni cardiache e renali. (Mitsuo Kato, 2013) . La retina è il tessuto che subisce il danno maggiore perché, seppure è il tessuto dalle dimensioni minori, è quello con più alta attività metabolica e quindi più sensibile ad alterazioni metaboliche importanti, quali quelle del glucosio che è l'unica molecola zuccherina usata dai mammiferi per ottenere energia (Gábríel, 2013; Krisztina Szabadfi E. P., 2014). I danni dell'iperglicemia, derivano dal fatto che alterando la biochimica della cellula, si accumulano molti intermedi metabolici tossici, si genera OS e si attivano processi infiammatori. La DR si sviluppa nel 75% dei pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1 e nel 50% dei pazienti con diabete mellito di

tipo 2; questi dati confermano che all'aumentare del tempo di persistenza degli alti livelli di glucosio nel sangue, aumenta la predisposizione allo sviluppo della patologia; ciò trova spiegazione nel fatto che il diabete mellito 1 si sviluppa già in giovane età rispetto al tipo 2, per cui nel primo caso si ha per un tempo di gran lunga maggiore la condizione iperglicemica con conseguente maggior accumulo di metaboliti tossici (Szabadfi, Neuropeptides, Trophic Factors,, 2014; Gábriel, 2013).

Si distinguono due forme cliniche di DR, una forma più precoce detta NPDR (retinopatia diabetica non proliferativa) e una forma più tardiva e quindi più grave, detta PDR (retinopatia diabetica proliferativa). L'elemento che distingue le due forme è l'assenza o presenza di *proliferazione* di nuovi vasi sanguigni nella macula; una delle componenti cliniche caratterizzanti le fasi più gravi della DR è la neo-vascularizzazione della macula, quindi è chiaro che ciò non avviene nella forma NPDR, ma nonostante ciò la forma NPDR è distinta in lieve, moderata e grave (Joanna M. Tarr, 2013; Gábriel, 2013). Nella forma NPDR, si osservano altri sintomi della DR, come micro-aneurismi, emorragie, aderenza leucocitaria al tessuto vascolare ed essudati nello spazio extra-vascolare (depositi di lipidi) (Gábriel, 2013; Cheung N, 2010) (Fig.7). Uno dei segni di retinopatia proliferativa è l'edema maculare che però può avere anche un decorso indipendente da questa patologia. Diventa invece significativa la proliferazione vascolare e la proliferazione fibrovascolare, questi due fenomeni indicano una situazione di retinopatia diabetica avanzata, è infatti a causa della presenza del tessuto fibrotico che si realizza il distaccamento della retina dalla coppa ottica, in quanto questo tessuto esercita trazione sulla retina; ciò determina l'alterazione irreversibile della vista fino alla cecità (Cheung N, 2010) (Fig.8).



Figura 7. Retina NPDR, presenza di microaneurismi, essudati e piccole emorragie. Tratto da Cheung et al. 2010.

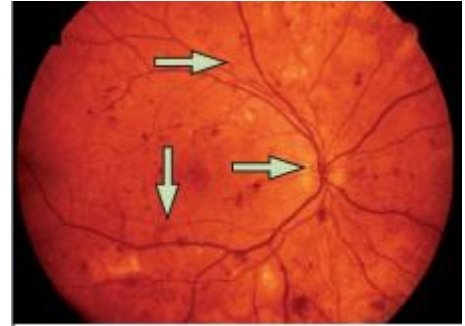


Figura 8 Retina PDR; neovascolarizzazione e presenza di tuft. Tratto da Cheung et al. 2010.

L'iperglicemia quindi rappresenta l'iniziatrice del danno, provocando una serie di alterazioni biochimiche-fisiologiche che portano ad uno stadio di *ischemia* che rappresenta l'elemento chiave nell'inizio di una cascata in cui ogni evento patologico che si realizza è la concausa dell'altro e che determina in ultimo la disfunzione vascolare della retina. (Cheung N, 2010) Il disastro fisiologico a cui si assiste è dato dall'alterazione dell'unità neuro-vascolare, di cui si discuterà più accuratamente in seguito.

L'ischemia è la manifestazione contemporanea di tre condizioni: ipossia (insufficiente apporto di O₂) o anossia (assenza completa dell'apporto di O₂), insufficiente apporto di molecole nutritive e inadeguata rimozione dei prodotti metabolici di scarto (Neville N. Osborne*, 2004), quindi è chiara l'esigenza della retina di avere rapidamente la formazione di un gran numero di nuovi vasi sanguigni ma, nonostante ciò essa non riesce ad adattarsi positivamente allo stress che inizia con l'iperglicemia, ma che conduce a tante altre condizioni stressanti, quali lo OS.

Sin dall'inizio a causa delle manifestazioni cliniche della malattia, l'attenzione è stata sempre focalizzata sull'angiogenesi, sull'aumento della permeabilità vasale, sulla leucostasi e quindi per molto tempo la DR è stata considerata una malattia del microcircolo (Anne B. Fulton¹, 2009; Kato, 2013; Gábriel, 2013). In realtà già dal lavoro di Barber fatto nel 1998 è emerso che ancor prima delle manifestazioni cliniche esiste una sofferenza della neuro-retina e che questa precede il danno vascolare (J. Barber, 1998; Gábriel, 2013; Krisztina Szabadfi E. P., 2014). Uno degli aspetti che supporta l'ipotesi della neuro-degenerazione retinale è il fatto che con l'avanzare della DR si ha una lenta e graduale perdita di cellule ganglionari e di cellule amacrine, con conseguente riduzione dell'ispessimento della retina. Inoltre si assiste al rilascio alterato di molecole vasoattive da parte dei neuroni retinici; è di rilevanza importante l'abbondante quantità di VEGF (fattore di crescita endoteliale vascolare) rilasciato, insieme anche al rilascio di molecole pro-infiammatorie. Ciò afferma che si può parlare dell'alterazione dell'unità neuro-vascolare, che è intesa come

insieme di interazioni tra neuroni retinici, glia e cellule vascolari, tutti questi tipi cellulari sono costantemente immersi in una soluzione interstiziale in cui sono presenti con la giusta omeostasi metaboliti, ioni, acqua proteine e molecole segnale che danno sostegno alle cellule e permettono che si realizzino tutte le interazioni tra i diversi tipi cellulari per l'ottenimento di una sinergia metabolica e di una comunicazione paracrina, esiste dunque un'armonia di coordinazione delle attività cellulari in modo da garantire costantemente il corretto funzionamento del tessuto e da rispondere prontamente ed efficacemente ad eventuali perturbazioni esterne (Timothy S. Kern1, 2014)(Fig.10).

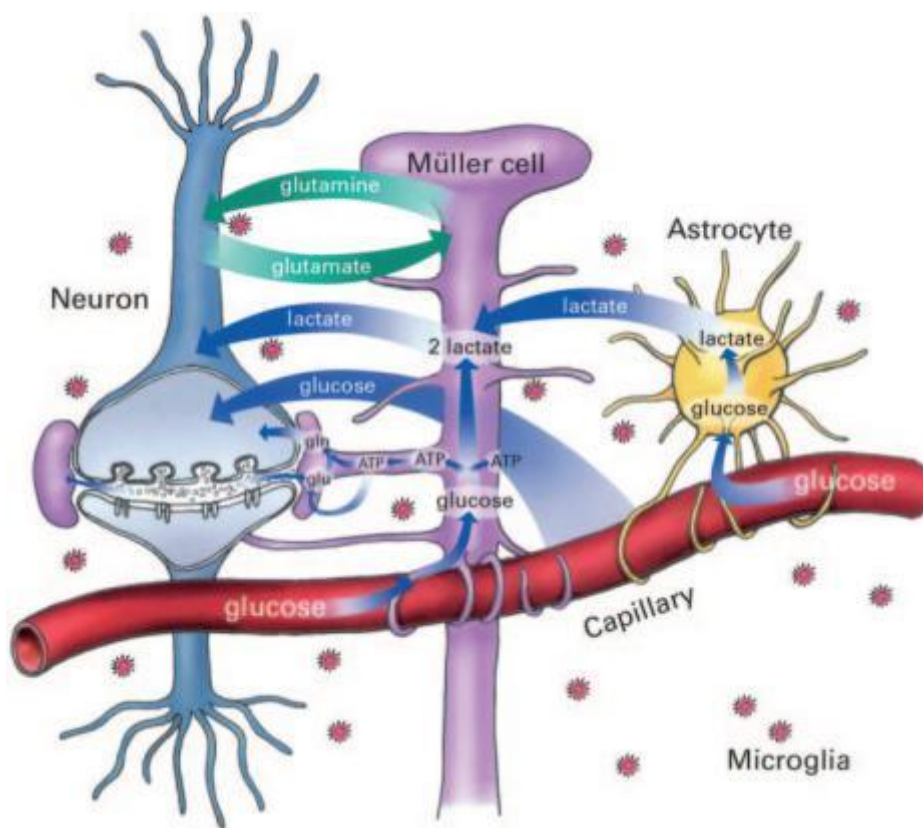


Figura 9 Unità neurovascolare. Tratto da Antonietti et. Al 2006.

1.2.2. Come l'iperglicemia crea stress nella retina

Non è chiaro quali siano gli esatti meccanismi metabolici e biochimici che si realizzano nella cascata patogenetica della DR e non si conoscono esattamente le cause primarie ma, è chiaro che l'iperglicemia causa squilibrio metabolico e OS che in ultima analisi conduce a ischemia e danno tissutale.

Il diabete determina danno funzionale per lo più in quei tessuti in cui le cellule sono insulina-indipendente, perché in queste cellule aumentano notevolmente le concentrazioni di glucosio intracellulare. In condizioni fisiologiche l'insulina permette alle cellule insulina-dipendente di internalizzare il glucosio e metabolizzarlo ma, esistono anche cellule insulina-indipendente che esprimono costitutivamente trasportatori di membrana GLUT-1. Come vedremo, si pensa che GLUT-1 sia un fattore determinante nella progressione della patogenesi della DR (Kumagai, 1999). Attraverso GLUT-1 il glucosio entra all'interno della cellula, ciò accade nelle cellule renali, in quelle del SNC e quindi anche nella retina; in particolar modo cervello e retina sono dipendenti dall'approvvigionamento di glucosio in quanto non hanno riserve di glicogeno tali da fronteggiare l'elevata attività metabolica del loro stesso metabolismo, inoltre tra loro stessi e il sangue è presente la barriera ematoencefalica o retinica rispettivamente, per cui sono tessuti protetti da barriere ed è grazie a GLUT-1 che il glucosio è trasportato in questi tessuti attraverso la barriera ematica. GLUT-1 è un trasportatore di glucosio dipendente dal sodio, ed è espresso dalle cellule endoteliali, epiteliali, dalle cellule di Muller, ma anche dalle cellule ganglionari; questo trasportatore è saturabile e facilita il trasporto di glucosio, sia attraverso la barriera ematoretinica interna e sia esterna (Kumagai, 1999).

Il fatto che sia saturabile fa sì che limiti l'impatto dell'iperglicemia, ma alcuni studi fatti mediante comparazione di tessuti di retina ex-vivo di pazienti diabetici post-mortem con retine di pazienti sani post-mortem, hanno suggerito che nelle fasi precoci della DR si ha un up-regolazione di GLUT-1 e ciò aumenta l'impatto dell'iperglicemia, perché aumenta notevolmente la concentrazione intracellulare di glucosio, che a lungo termine causa notevoli danni metabolici. (Kumagai, 1999).

Nonostante ci sia ancora non chiarezza sugli esatti danni metabolici causati dall'iperglicemia che portano allo sviluppo delle lesioni micro-vascolari osservate nelle retine con DR, sono state proposte alcune vie biochimiche coinvolte nella cascata patogenetica della DR, come: l'aumento della via dei polioli fosfato, l'attivazione della diacilglicerolo DAG, l'attivazione della PKC (proteina chinasi C), formazione accelerata di AGEs (prodotti finali di glicazione non enzimatica), attivazione di RAAS (sistema renina angiotensina aldosterone), ottenimento di OS, aumento del rilascio di VEGF e IGF1 (fattore di crescita insulina simile1), leucostasi, infiammazione e OS (Joanna M. Tarr, 2013; FONG, 2004; Cheung N, 2010).

Attivazione della via dei polioli-fosfato

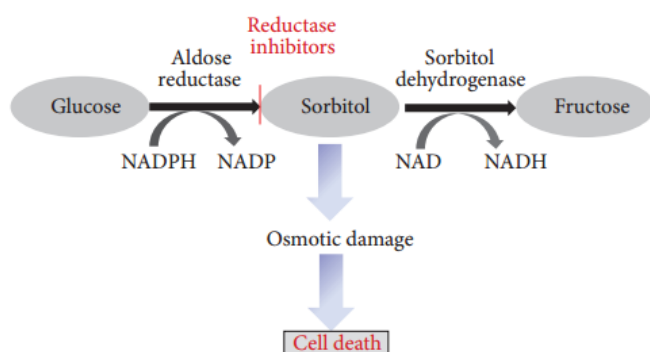


Figura 10 Via dei polioli fosfato. Tratto da Tarr et. al 2013.

Questa via biochimica è detta anche via della sorbitolo-aldoso deidrogenasi, si tratta di un processo biochimico che in condizioni fisiologiche ha una bassa attività ma, con l'iperglicemia si attiva notevolmente in quanto la via glicolitica è satura e parte del glucosio è metabolizzato dall'aldoso reduttasi che è l'enzima che catalizza il primo step del processo (Fig.10). Da quest'attività metabolica si instaurano grossi problemi che causano danni importanti alla fisiologia della cellula.

Quando il glucosio entra in tale pathway sarà convertito in sorbitolo che è un pentoso fosfato, da qui il nome della via; la conversione è catalizzata dall'aldoso reduttasi (AR) che usa come cofattore NADPH ma, si tratta di uno step lento, per cui il sorbitolo formatosi è in concentrazioni nettamente superiori all'ultimo intermedio metabolico che è il fruttosio. Il sorbitolo è infatti convertito in fruttosio grazie all'azione catalitica della sorbitolo deidrogenasi (SDH). In entrambi gli step biochimici si generano danni per la cellula; il primo problema deriva dall'accumulo intracellulare del sorbitolo, perché non è capace di attraversare la membrana citoplasmatica e non esistono trasportatori specifici per esso, quindi si accumula nella cellula alterando l'osmolarità cellulare. Inoltre considerando che il NADPH è importante per ridurre il glutathione, il suo consumo determina limitazione della disponibilità di glutathione ridotto con conseguente diminuzione del potere antiossidante della cellula, si converge così verso lo *stress ossidativo*. La riduzione di NADPH, sposta anche il rapporto NADH/NAD^+ che attiva la NADH-ossidasi da cui si ottengono ROS (specie reattive dell'ossigeno) (Joanna M. Tarr, 2013). L'altro problema è legato all'ottenimento di fruttosio che seppur con un basso flusso di formazione dal sorbitolo, la quantità ottenuta è sufficiente a portare avanti la glicazione non enzimatica delle proteine; può essere infatti, convertito a fruttosio-3-fosfato che può degradarsi a 3-deossiglucanone ed entrambi sono due

potenti agenti glicanti e quindi da qui si ottiene la formazione di AGEs (*prodotti finali di glicazione non enzimatica*) che hanno effetti nocivi per la cellula. (Joanna M. Tarr, 2013).

Formazione accelerata di AGEs

Gli AGEs sono un gruppo eterogeneo di molecole derivanti dalla glicazione di proteine e di altre molecole biologiche. (Stitt, 2001). Queste molecole finali di glicazione non enzimatica, si producono fisiologicamente sin dallo sviluppo embrionale con un tasso di formazione molto basso e tendono ad accumularsi nel tempo; oggi è chiaro che l'accumulo di AGEs porta a malattia neurodegenerative come Alzheimer o arteriosclerosi, dove appunto c'è un accumulo di sostanze tossiche (Joanna M. Tarr, 2013; Stitt, 2001). Nelle condizioni di iperglicemia aumenta notevolmente il tasso di formazione degli AGEs, ciò crea danni alla cellula in quanto si tratta di molecole tossiche. (Fig.11) Il primo prodotto nella reazione di formazione degli AGEs è una base di Schiff's che si riarrangia nel giro di

alcuni giorni ottenendo i prodotti AMADORI da cui si ottengono gli AGEs (Joanna M. Tarr, 2013).

La tossicità degli AGEs si realizza in vari modi, innanzitutto questi metaboliti tossici formano legami

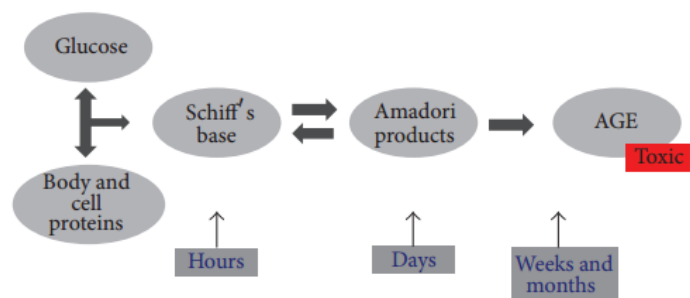


Figura 11. Formazione AGEs. Tratto da Tarr et. al 2013.

covalenti crociati tra le proteine presenti

nella cellula alterandone struttura e funzione; inoltre mediante il legame con recettori specifici RAGEs interagiscono sulla superficie cellulare in cui attivano eventi pro-ossidanti e pro-infiammatori, da cui si ottengono ROS. (Joanna M. Tarr, 2013; Loske, 1998; Stitt, 2001). La presenza di AGEs all'interno della retina gioca un ruolo importantissimo nella patogenesi della DR, alcuni studi hanno infatti trovato una correlazione tra i livelli di AGEs nei vasi sanguigni retinici di pazienti diabetici e la severità della patologia. (Joanna M. Tarr, 2013; Stitt, 2001). Ad esempio nello studio di Hammes del 1999 è stato mostrato che esiste anche una correlazione tra aumento dell'accumulo di AGEs e perdita di periciti che è un altro aspetto clinico della DR (Hans-Peter Hammes, 1995.) Studi in vitro hanno anche evidenziato che l'esposizione di cellule endoteliali vascolari di retina ad AGEs determina alterazione nell'espressione di eNOS sintasi, enzima importante per la sintesi di NOS che è un potente vasodilatatore, tale alterazione si verifica anche in vivo nelle condizioni di DR, dove esiste un'alterazione della regolazione vascolare che è un

punto chiave nel corretto funzionamento della retina. Altro aspetto rilevante è la relazione tra accumulo di AGEs e perdita di periciti e fallimento vascolare che probabilmente porta a occlusioni capillari e ischemia; in definitiva si può affermare che gli AGEs provocano lesioni microvascolari. Ciò è evidenziabile anche dal fatto che trattamenti che inibiscono la formazione degli AGEs hanno prevenuto la formazioni di lesioni micro-circolari ritardando la progressione della DR. (Stitt, 2001)

Attivazione della via DAG-PKC

La PKC (proteina chinasi C) è una proteina con attività serina/treonina chinasi dipendente dal calcio, regola la proliferazione cellulare, l'omeostasi del pH, l'induzione genica, la tumorigenesi e l'attività di altre proteine, mediante la fosforilazione di residui amminoacidici (WOOD, 1996). L'attività della PKC permette alla cellula di rispondere a stimoli cellulari in quanto, fa parte della via di trasduzione del segnale, che si realizza a seguito di interazione di alcune molecole segnale (neurotrasmettitori, ioni metallici, metaboliti, ormoni) con recettori di membrana accoppiati a proteine-G, dalla cui attivazione si realizza una cascata di eventi di fosforilazioni e de-fosforilazioni che attivano e disattivano determinate molecole. Si tratta di messaggeri secondari o terziari, come il DAG (diacilglicerolo) che a sua volta attiva diverse isoforme di PKC, in relazione al tipo di risposta cellulare. La PKC è attivata anche dal calcio che fuoriesce dal reticolo endoplasmatico a seguito di stimoli cellulari (Joanna M. Tarr, 2013).

L'attivazione prolungata della PKC a seguito di stimolazione continua a risposte cellulari, provoca gravi danni come acidosi, lipolisi, danni al DNA e produzione di radicali liberi (WOOD, 1996). L'iperglicemia determina l'incremento del tasso di glicolisi, in cui si ottiene tra i vari intermedi metabolici gliceraldeide-3-fosfato da cui c'è la produzione de novo di DAG che attiva PKC. (ZHAO-CHUN LIU1, 2014; Nyengaard, 2004; INOGUCHI*, 1992)(Fig.12). Alcuni studi hanno dimostrato che in condizioni di iperglicemia, ma anche di ipossia, aumenta la traslocazione dell'isoforma PKC beta nella membrana plasmatica e ciò conferma che con l'iperglicemia aumenta l'attivazione di PKC β (ZHAO-CHUN LIU1, 2014); inoltre è stata trovata correlazione tra attivazione di PKC e cambiamenti del flusso sanguigno, aumentata permeabilità vasale, cambiamento dell'ispessimento delle membrane basali, aumento dell'espressione di proteine della matrice extracellulare (fibronectina e collagene), aumento dell'espressione di mediatori vasoattivi (endotelina) e cambiamenti nella produzione e segnalazione intracellulare di VEGF (Nyengaard, 2004; FONG, 2004). Risulta dunque, un elemento chiave la PKC e in particolare la PKCBETA, nella patogenesi della DR (Joanna M. Tarr, 2013)

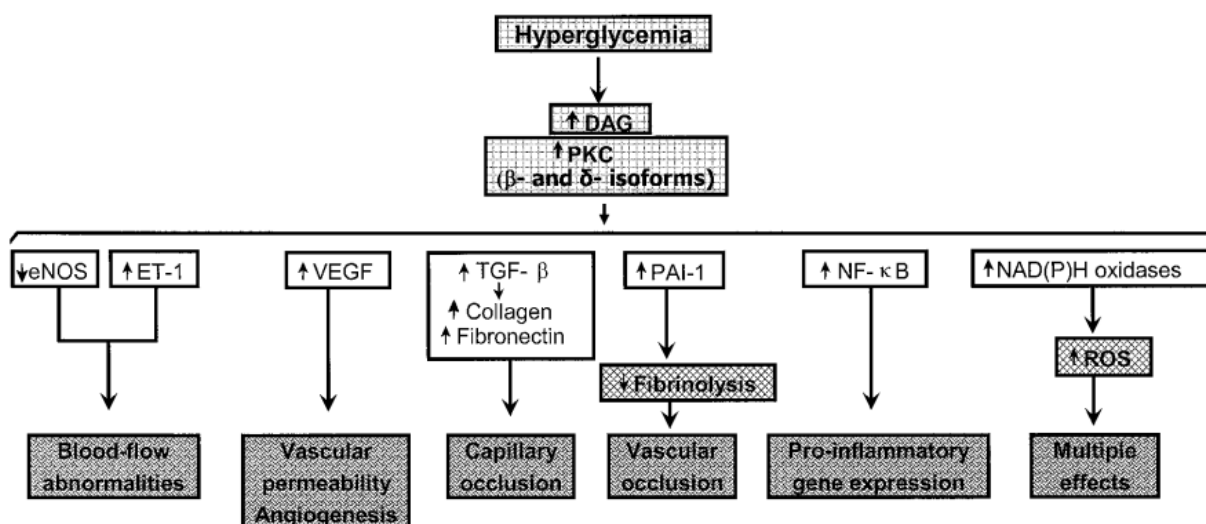


Figura 12. Attivazione della PKC e vie attivate dalla PKC. Tratto da Durham et. al 2011.

Sistema RAAS (sistema renina angiotensina)

Non solo il fattore di crescita endoteliale vascolare, noto come VEGF è responsabile del danno micro-vascolare retinico nella PDR, ma anche l'ormone vasoattivo angiotensina II ha un ruolo importante, come qui di seguito vedremo (Funatsu, 2002). RAAS è un sistema endocrino di regolazione della pressione sanguigna e dell'equilibrio dei fluidi. Anche questo sistema risulta alterato nelle condizioni iperglicemiche, rappresentando un altro elemento chiave nella DR, in particolare si osserva un aumento dell'espressione delle molecole segnale e dei recettori di questo sistema nella PDR (Joanna M. Tarr, 2013).

Il precursore dell'angiotensina II è l'angiotensinogeno che è convertito in angiotensina I e II dalla renina, derivante dalla pro-renina. L'angiotensina II regola la pressione sanguigna legandosi a recettori endoteliali sia per la vasocostrizione che per la vasodilatazione, si tratta di una molecola angiogenica; l'azione è svolta in combinazione con il VEGF (Wilkinson-Berka, 2006; Funatsu, 2002). Nei pazienti diabetici oltre ad essere stati trovati elevati livelli di prorenina nel plasma, che causa danni a livello glomerulare, sono stati trovati livelli notevoli di prorenina anche nei vari fluidi dell'occhio (Wilkinson-Berka, 2006). Anche non conoscendo ancora chiaramente con quale meccanismo RAAS causa danno nella DR, è evidente che agisce favorendo l'angiogenesi insieme al VEGF, ottenendo così danno al microcircolo della retina. Lo studio di Funatsu ha rilevato che esiste una correlazione tra angiotensina II e VEGF con la severità della DR (Funatsu, 2002).

Infiammazione e leucostasi

Tra gli elementi caratterizzanti la DR c'è la risposta infiammatoria, infatti tutte le vie biochimiche che risultano alterate, precedentemente descritte, contribuiscono ad avere una risposta infiammatoria nella retina. L'infiammazione rappresenta uno degli eventi che porta a danno del tessuto retinico. Si manifesta mediante aumento dell'attivazione dei macrofagi locali, aumento delle citochine, chemochine, aumento delle molecole di adesione cellulare ed è stata osservata una correlazione tra aumento delle molecole infiammatorie e aumento dell'attivazione leucocitaria e delle interazioni tra cellule endoteliali (Joanna M. Tarr, 2013). L'attivazione dei leucociti, il miglioramento del rolling leucocitario e l'adesione sulla superficie delle cellule endoteliali, attiva l'enzima C2GNT che durante la DR ha un'alta attività; è stata osservata anche una correlazione tra attività di questo enzima e severità della DR (Joanna M. Tarr, 2013). Una delle sue azioni è quella di attivare il fattore di necrosi tumorale $\text{TNF}\alpha$ che aumenta la O-glicosilazione sulla superficie dei leucociti, provocandone la disfunzione e la leucostasi, quest'ultima determina occlusioni capillari e morte delle cellule, mediata da ROS, amplificando le risposte infiammatorie (Joanna M. Tarr, 2013).

L'altro fenomeno indotto dall'infiammazione è l'attivazione della microglia, ciò è uno dei fattori con cui si ha propagazione del danno tissutale (*Fig.13*). La microglia ameboide ha l'obiettivo di mantenere l'omeostasi retinica e nel caso in cui vi siano insulti al tessuto questa risponde mediante la sua attivazione, proliferazione e migrazione (Joanna M. Tarr, 2013) (Langmann1, 2007). L'obiettivo è quello di riparare e proteggere il tessuto dai danni, ma nel caso in cui, come si ottiene con il diabete mellito, l'insulto è cronico, anche l'attivazione della microglia diventa cronica, per cui la sua attività, intesa anche come sensore di perturbazione, è annullata e le molecole bioattive segregate da tali cellule causano danno retinico e degenerazione neuronale. Le molecole rilasciate sono: IL-1 , $\text{TNF}\alpha$, ROS, glutammato, NO, molecole infiammatorie, caspasi; inoltre si ha aumento del rilascio di molecole pro-infiammatorie, di recettori delle citochine e chemochine, dei recettori delle immunoglobuline, dei recettori dei fattori di crescita e dei fattori di crescita stessi (VEGF), delle metallo proteine della matrice extracellulare, le stesse responsabili della patogenesi della DR, per cui il danno retinico viene stabilizzato mediante tale risposta infiammatoria (Langmann1, 2007; Joanna M. Tarr, 2013).

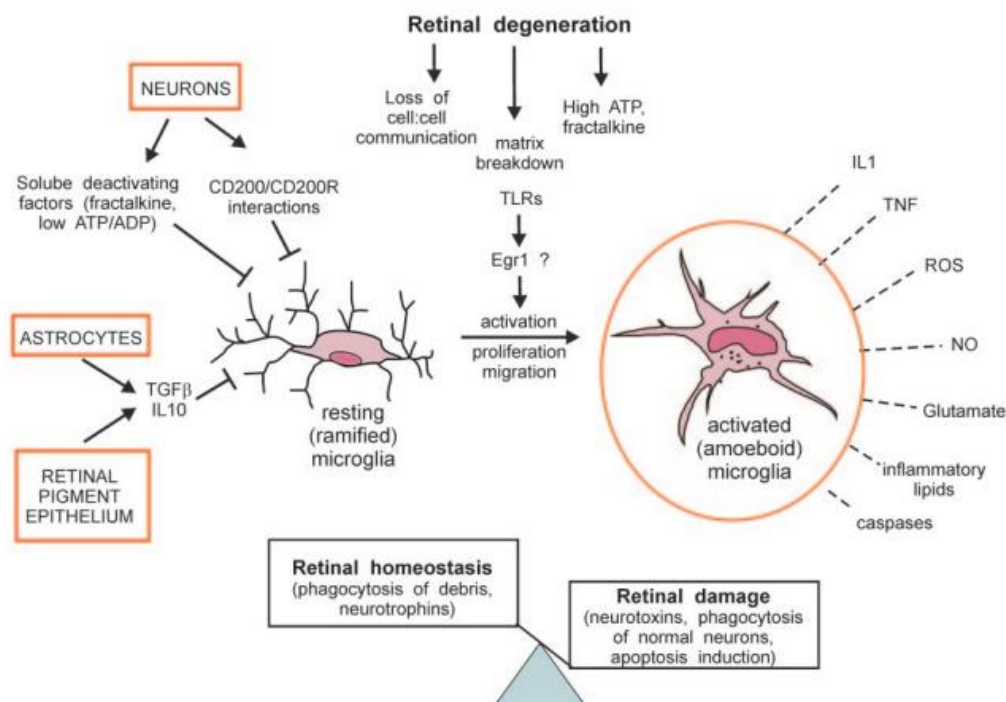


Figura 13. Attivazione della microglia. Tratto da Langman 2007.

Stress ossidativo

La retina ha il più alto tasso di consumazione degli acidi grassi e richiede continuo apporto di O_2 per l'elevata ossidazione del glucosio, dato che è un tessuto continuamente attivo nella conversione dei segnali luminosi in segnali elettrici, quindi risulta il tessuto più vulnerabile allo OS rispetto a tutti gli altri tessuti dell'organismo (Chan, 2007; RandaS.Eshaq, 2014).

Lo stress ossidativo è inteso come lo squilibrio tra i livelli di ROS e di agenti antiossidanti all'interno della cellula. Fisiologicamente la cellula combatte quotidianamente contro lo OS utilizzando scavenger e molecole antiossidanti che detossificano la cellula dai ROS ma, nel momento in cui sono incrementati i livelli di tali specie reattive dell'ossigeno, l'efficacia delle molecole antiossidanti viene meno e si stabilizza una situazione di OS che con l'iperglicemia è aggravata anche dalla riduzione di disponibilità di glutathione ridotto (Chan, 2007; Joanna M. Tarr, 2013). Si assiste infatti, a un aumento di ROS e diminuzione di glutathione, tireodoxina, e altre molecole antiossidanti, capaci di difendere la cellula dallo OS.

I ROS sono una famiglia di molecole costituita da specie reattive dell'ossigeno, come radicali liberi altamente reattivi (anione superossido $O_2^{\cdot-}$ e l'ossidril OH^{\cdot}) e molecole ossidanti reattive non radicaliche, quali perossido d'idrogeno (H_2O_2), che danneggiano la cellula reagendo con molecole

biologiche importanti, come carboidrati, lipidi, proteine e acidi nucleici causando gravi danni di tipo strutturale e funzionale.

Come abbiamo potuto notare, nella DR la via dei polioli fosfato che è molto attiva, arreca OS alla cellula sia perché riduce le capacità antiossidanti, e sia perché si ha attivazione della NADH-ossidasi che aumenta la produzione di $O^{\cdot -}$. Inoltre l'iperglicemia stessa, aumentando il flusso della via glicolitica, porta all'aumento di $O^{\cdot -}$ e H_2O_2 . Accade anche che il coenzima Q cede elettroni a O_2 ottenendo $O^{\cdot -}$ che grazie alla superossido dismutasi è convertito in H_2O_2 e l'ottenimento di alti livelli di questa molecola rendono H_2O_2 un aspetto molto indagato negli ultimi anni. Inoltre l'anione $O^{\cdot -}$ può reagire anche con NO ottenendo l'anione perossinitrico $ONOO^{\cdot -}$, anch'esso altamente reattivo (Brownlee, The Pathobiology of Diabetic Complications, 2004; DU, 2003; RandaS.Eshaq, 2014).

Gli elevati livelli di ROS creano danno alle macromolecole, tra cui il DNA, ciò attiva un enzima PARP (polimerasi poli ribosio-ADP), il quale risiede nel nucleo nella forma inattiva e si attiva nel momento in cui ci sono danni al DNA, in quanto la sua funzione è quella di riparare il DNA da eventuali danni (Brownlee, The Pathobiology of Diabetic Complications, 2004). L'attivazione di PARP porta a modificazioni chimiche dell'enzima GADPH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi), riducendone l'attività e ciò aumenta il flusso metabolico del glucosio attraverso la via dei polioli fosfato, aumenta quindi la produzione di AGEs e aumenta l'attivazione della PKC (in quanto l'inibizione della deidrogenazione della gliceraldeide-3-fosfato incrementa la via DAG-PKC). Ecco che lo stress ossidativo può essere visto come un *"meccanismo unificante"* le alterazioni biochimiche coinvolte nella patogenesi della DR, diventando un elemento chiave nello sviluppo e progressione della patologia retinica (Brownlee, The Pathobiology of Diabetic Complications, 2004). Inoltre è facilmente deducibile che tale evento patologico lega l'alterazione molecolare delle cellule retiniche, in cui si ottengono alte concentrazioni di glucosio intracellulari, con il manifestarsi dei danni strutturali e funzionali della cellula e del tessuto, ottenendo morte cellulare per apoptosi e disfunzioni funzionali della retina con patologia micro-vascolare. Sebbene lo OS aumenta notevolmente con la disfunzione mitocondriale e determina l'alterazione delle vie metaboliche sopracitate, già queste ultime, prima e forse contemporaneamente al danno mitocondriale, contribuiscono all'aumento dello OS (Fig.14).

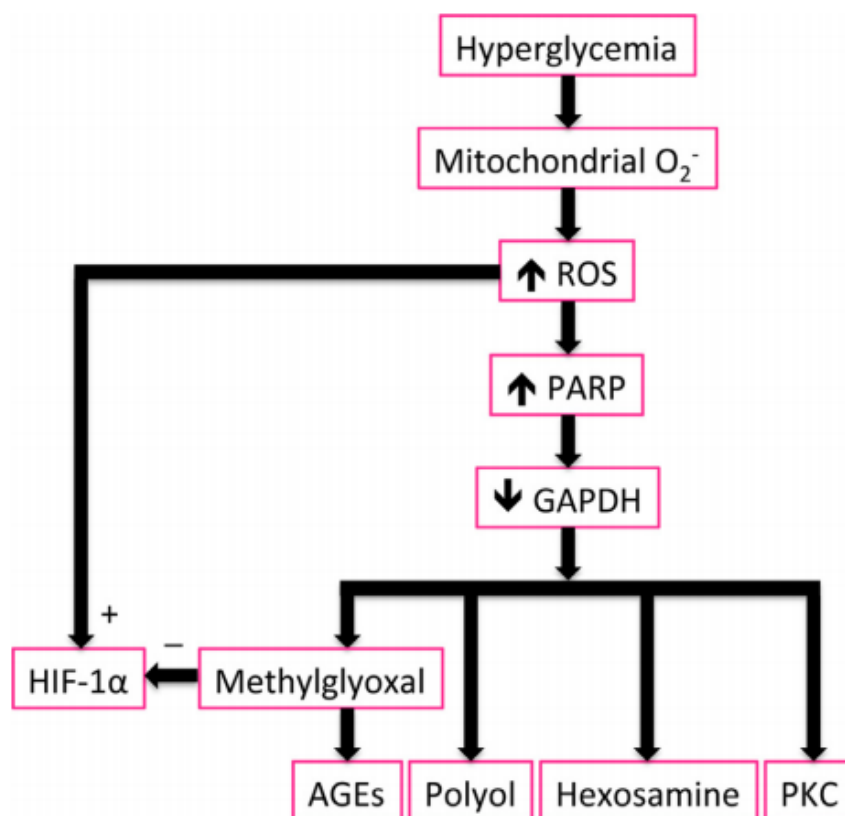


Figura 14. L'iperglicemia induce OS. Tratto da Eshaq et. Al 2014.

Ischemia

In questa situazione di “caos biochimico” la morte dei neuroni e delle cellule vascolari causa la rottura della barriera emato-retinica, per cui non vi è più una sufficiente vascolarizzazione e così si instaura una condizione ischemica che favorisce la morte per apoptosi delle cellule retiniche e il danno tissutale, in quanto viene a mancare il giusto sostegno all'attività neuroretinale, da parte del sistema vascolare. Per ischemia s'intende una situazione di ipossia (insufficiente apporto di O_2) o anossia (assenza totale dell'apporto di O_2), insufficiente apporto di molecole metaboliche e inadeguata rimozione dei metaboliti di scarto (Neville N. Osborne*, 2004). Le prime lesioni ischemiche si manifestano come disordine della membrana basale con assottigliamento e perdita di periciti intramurali. Esiste una sensibilità diversa nei vari tipi cellulari della retina; i fotorecettori risultano essere il tipo cellulare retinico più resistente, probabilmente perché sono ricchi di neuroglobina (Neville N. Osborne*, 2004). La neuroglobina è una proteina globinica che ha il 25% di similarità con emoglobina e mioglobina, è capace di legare reversibilmente l' O_2 , grazie allo ione Fe^{2+} del gruppo eme. Sembra che questa proteina giochi un ruolo importante nell'omeostasi del tessuto nervoso e probabilmente la sua maggior concentrazione nel tessuto nervoso è nella retina,

perché quest'ultima ha le più alte richieste metaboliche e consumo di ATP, a causa dell'intensa attività di cattura, conversione e trasmissione del segnale luminoso. In particolare i fotorecettori che hanno la più alta attività, presentano le maggiori concentrazioni di neuroglobina, che ne favorisce l'assorbimento di ossigeno, ecco che in condizioni ischemiche questo tipo cellulare è più resistente (Marc Schmidt, 2003). Le lesioni ischemiche intese come cambiamenti morfologici e funzionali del tessuto retinico derivano dalla deplezione di ATP immagazzinato che è una diretta conseguenza della carenza di glucosio e di ossigeno (Neville N. Osborne*, 2004); le lesioni ischemiche conducono allo stadio patologico, in cui risultano alterati i movimenti ionici, metabolici e il rilascio dei neurotrasmettitori. È proprio l'alterazione del rilascio di glutammato (neurotrasmettitore) uno dei primi fenomeni che porta a morte cellulare per apoptosi a seguito dell'ischemia. Accade infatti che, per compensare il deficit di glucosio derivante dalla condizione ischemica, le cellule di Muller hanno alta attività glicolitica e di conseguenza le cellule ganglionari metabolizzano tanto lattato con conseguente elevato rilascio di glutammato. Il glutammato rilasciato in eccesso ha però azione ecitotossica perché eccita in tempi prolungati i neuroni retinici, rende inefficiente l'uptake da parte della glia causandone la depolarizzazione prolungata dei neuroni post-sinaptici, che porta ad apoptosi neuronale (Neville N. Osborne*, 2004). Inoltre il decremento dell'ATP altera l'omeostasi ionica, dato che esso è un importante elemento nelle pompe ioniche ATPasiche, come Na^+/K^+ ATPasi, quindi ciò conduce all'alterazione del potenziale di membrana, con eccessiva depolarizzazione e apoptosi cellulare (Neville N. Osborne*, 2004). Il tessuto risponde all'ischemia e alle altre alterazioni biochimiche mediante neo-angiogenesi, con l'obiettivo di compensare il deficit metabolico (Neville N. Osborne*, 2004).

1.2.3. Vasculopatia e Angiogenesi

L'immagine di una retina diabetica è unica e ciò ne permette il facile riconoscimento, questo è dovuto alle lesioni vascolari che si manifestano, aggravandosi con la progressione della patologia, come risultato fallimentare del processo neo-angiogenico, che vorrebbe riparare e limitare le lesioni ischemiche. Tra le prime lesioni vascolari che si manifestano si osserva la dilatazione arteriolare retinica, ciò può essere considerato come un indicatore fisiologico dell'alterazione dell'autoregolazione del flusso sanguigno che è dipendente dalla progressione della DR, infatti da

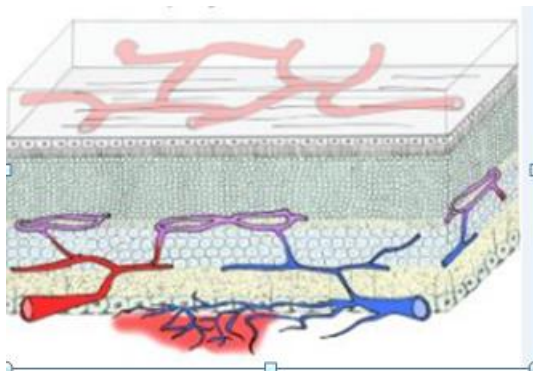


Figura 15. Aberrazioni vascolari. Tratto da Cuenca et. al 2014.

alcuni studi è emerso che il decremento del flusso sanguigno, che si verifica nella fase precoce, è correlato con l'avanzamento della malattia (Cheung N, 2010; Nicolás Cuenca, 2014; Gábrriel, 2013; Timothy S. Kern¹, 2014). Ciò conduce a micro-aneurismi; inoltre nella fase NPDR sono presenti capillari non perfusi (segno di ischemia), perdita di periciti e di cellule endoteliali, precoce ispessimento delle membrane basali, perdita delle proteine che formano le giunzioni strette cui

consegue l'aumentata permeabilità, ancora si hanno capillari lesionati e quindi edemi ed essudati fino a rottura con conseguente emorragie, con manifestazioni che possono interessare anche il corpo vitreo e il nervo ottico (Cheung N, 2010; Durham JT, 2011.); le emorragie diventano importanti nella fase PDR. La fase PDR è infatti caratterizzata da emorragie retinali. La peculiarità principale della PDR è però la proliferazione del letto capillare con tendenza all'arborizzazione, infatti andando avanti nell'evento patologico si formano i *tuft ovvero* grovigli di capillari, oltre che alla formazione di nuovi vasi sanguigni che presentano interruzioni improvvisa (Fig.15). Inoltre si ha proliferazione fibrovascolare, che esercita trazione sulla retina con distacco di quest'ultima, parziale o totale, dalla coppa ottica. Questo evento porta alla perdita parziale o totale della vista (Cheung N, 2010). L'evento neo-angiogenico, responsabile della proliferazione capillare, è la risposta compensatoria del tessuto all'ischemia indotta dall'iperglicemia, il cui segnale principale è l'insufficiente pressione di O_2 che porta ad uno squilibrio tra i fattori pro-angiogenici e anti-angiogenici a favore dei primi. Uno dei principali fattori pro-angiogenici responsabile della neo-vascularizzazione retinica è il VEGF (fattore di crescita endoteliale vascolare), si ha accumulo di questa molecola nella retina e nel vitreo di pazienti diabetici. In realtà VEGF è solo uno dei fattori la cui trascrizione e traduzione aumenta come risposta cellulare di una via di trasduzione del segnale sostenuta da HIF- α e stimolata dalla bassa pressione di O_2 .

HIF- α è uno dei principali regolatori della vascolatura nei mammiferi. Esso regola l'espressione di fattori che sostengono l'angiogenesi, ma regola anche l'espressione dei loro recettori; inoltre regola l'espressione di tante altre molecole, anche di tipo enzimatico, che aiutano il tessuto ad adattarsi ai cambiamenti metabolici indotti dal diabete (Patrick H. Maxwell, 2002). HIF- α è una proteina etero-dimerica, costituita da una subunità α e una subunità β . I livelli del suo mRNA aumentano durante l'ipossia e ancor più aumentano i livelli proteici. L'aumento dei livelli proteici

di HIF- α sono da attribuire al fatto che in condizioni fisiologiche, di normossia, la subunità α subisce un'idrossilazione su un residuo di prolina conservato, ciò conduce alla sua degradazione da parte del complesso ubiquitina E3-ligasi (Patrick H. Maxwell, 2002). Durante l'ischemia, accade invece che la bassa tensione di O₂ impedisce l'idrossilazione della subunità α , per cui quest'ultima si lega alla subunità β ; a questo punto HIF- α è capace di traslocare nel nucleo dove attiva la trascrizione di vari fattori pro-angiogenici e di molecole che sostengono la retina nelle condizioni avverse (Patrick H. Maxwell, 2002). Nonostante siano svariate le molecole la cui trascrizione è attivata da HIF- α , VEGF è il fattore pro-angiogenico che ha il ruolo più determinante nella disfunzione vascolare. Intorno agli anni 50' Michaelson comprese che l'angiogenesi guida le retinopatie proliferative e nel 1956 Wise attribuì a un "fattore x", sconosciuto, extravascolare ma intraretinale, la responsabilità della formazione dei nuovi vasi sanguigni per angiogenesi (Neville N. Osborne*, 2004; Presta, 2013). Più avanti nel tempo si scoprì dell'esistenza del VEGF nella retina di bovino e si comprese la sua funzione su studi condotti su primati e umani (Neville N. Osborne*, 2004). L'up-regolazione di VEGF è stata associata alla rottura della barriera emato-retinica, all'aumentata permeabilità dei vasi sanguigni e alla neo-vascularizzazione (Presta, 2013). Come in seguito approfondiremo, sono diverse le cellule che aumentano la secrezione di VEGF, dai fotorecettori alle cellule neuronali. Tra gli altri fattori pro-angiogenici stimolati da HIF- α , troviamo: IGF1 (fattore di crescita insulina simile1), FGFs (fattore di crescita dei fibroblasti), PlGF (fattore di crescita placentale), Ang1 (angiopoietina1), PDGF (fattore di crescita derivato dalle piastrine) ed eritropoietina (Presta, 2013); ciò suggerisce l'importanza sinergica dei vari fattori pro-angiogenici, nonostante il ruolo predominante di VEGF. Oltre a tali fattori, HIF- α stimola anche la trascrizione di molecole infiammatorie come citochine e chemochine (Presta, 2013).

L'angiogenesi è un processo fisiologico in cui si ottiene la formazione di nuovi capillari mediante la gemmazione da vasi sanguigni già esistenti. È importante in processi fisiologici come la vascularizzazione durante lo sviluppo embrionale, la riparazione di ferite ed è anche uno dei vari processi fisiologici sfruttati dai tumori; infatti essi crescono grazie all'angiogenesi, in modo da assicurarsi nutrizione e rifornimento di ossigeno all'aumentare delle proprie dimensioni. Con l'angiogenesi si ottiene vasodilatazione così da poter far permanere più tempo le molecole che favoriscono l'angiogenesi e la chemiotassi. Nella situazione patologica che si verifica con il diabete, l'angiogenesi porta però alla formazione di vasi aberranti con le caratteristiche sopra-citate e all'adesione leucocitaria con occlusioni capillari, quindi rappresenta il meccanismo fallimentare

con cui la retina cerca di adattarsi alle condizioni avverse, anzi favorisce il danno vascolare, perché stabilizza e fa perdurare l'ischemia.

1.2.4. Non solo vasculopatia: Neurodegenerazione

Nonostante siano indiscutibili le manifestazioni cliniche dei gravi danni vascolari nella DR, molti lavori scientifici hanno dimostrato e continuano ancora oggi, che gli stadi più precoci della malattia sono caratterizzati da danni neuronali e parlando più appropriatamente della DR non si può non affermare che si tratta di una malattia neurodegenerativa. Gli aspetti da chiarire sono molteplici e soprattutto l'aspetto più dubbio riguarda l'ordine degli eventi fisiopatologici, ma molti esperimenti dimostrano un inizio della malattia rappresentato da danni neuronali. Classicamente la DR è stata considerata una malattia microvascolare ma, l'apoptosi neuronale e l'attivazione gliale, trovati spesso nelle retine di donatori privi o con lievi anomalie microvascolari, molti anni prima della morte, suggeriscono che non si tratta solo di una malattia microvascolare (Angela M. Valverde, 2013). Più di quarant'anni fa alcuni studi istopatologici hanno enfatizzato la perdita di neuroni nella retina diabetica umana (David A. Antonetti, 2006). Analisi dell'attività dei neuroni retinici fatti con elettroretinogramma (ERG), mostrano infatti, perdita del potenziale oscillatorio all'inizio della patologia, ma prima ancora delle lesioni microvascolari (David A. Antonetti, 2006). Fu Barber e il suo gruppo di lavoro a osservare per la prima volta che si ha perdita del potenziale oscillatorio dell'attività dei neuroni retinici ancor prima delle lesioni vascolari. Questo studio fu condotto su retine di ratti con diabete indotto da streptozotocina (STZ, è un farmaco che uccide le cellule del pancreas, produttrici di insulina) e su pazienti umani diabetici da almeno quarant'anni; venne dimostrato che a un mese dall'induzione del diabete nei ratti, si osservava perdita per apoptosi dei neuroni retinici, ciò giustifica la perdita del potenziale oscillatorio. Da questo lavoro nacque l'ipotesi che la neurodegenerazione retinale si ottiene precocemente e partecipa allo sviluppo della vasculopatia (Alistair J. Barber E. L., 1998.). I risultati dell'ERG sono sostenuti anche da indagini di tipo molecolare, fatti su retine di pazienti diabetici postmortem, le quali esibiscono un aumento dei marker di apoptosi neuronale, mentre gli studi condotti su retine di ratti diabetici sperimentali mostrano oltre all'apoptosi neuronale e alla perdita graduale delle GCR, anche l'attivazione gliale con aumento della proteina fibrillare gliale (GFAP) nelle cellule di Muller, l'alterazione del metabolismo e l'attivazione della microglia, solo dopo un mese dall'induzione del

diabete; ecco che tutti questi elementi sono indice di neurodegenerazione, in quanto sono comuni ad altre malattie neurodegenerative (David A. Antonetti, 2006; Marta Villarroel, 2010 ; Barber, (2003); Simó, 2012). L'apoptosi si osserva oltre che nelle GCR, anche nei fotorecettori e nell'RPE (Marta Villarroel, 2010). La degenerazione neuroretinale potrebbe essere iniziata da varie vie metaboliche e di segnalazione che partecipano ai processi microangiopatici, come la distruzione della barriera ematoretinica (Marta Villarroel, 2010). I meccanismi che portano alla neurodegenerazione retinica sono ancora da conoscere bene e sono processi molto complessi e ampi, inoltre non è chiaro quale dei due eventi caratterizzanti la neurodegenerazione, apoptosi neuronale e attivazione gliale, si realizzi per primo (Marta Villarroel, 2010). L'altro aspetto che supporta l'ipotesi che l'evento precoce è la neurodegenerazione, è la perdita della discriminazione cromatica e della sensibilità del contrasto, quest'alterazione funzionale può essere rivelata con indagini di elettrofisiologia e si riscontrano ancor prima dei danni vascolari e solo dopo due anni dallo sviluppo del diabete (Simó, 2012). In definitiva, si può affermare che l'alterazione funzionale del tessuto, la quale si presenta molto tempo prima delle manifestazioni cliniche di tipo vascolare, sostiene la tesi che negli stadi precoci della DR è la neurodegenerazione la protagonista della patologia e questa insieme ad altri meccanismi, contribuirà alla progressione patologica fino all'ottenimento dei danni vascolari (Simó, 2012). Nasce dunque, l'ipotesi "*neurodegenerative-first*" secondo la quale l'iperglicemia ha come bersaglio iniziale la componente nervosa (Marta Villarroel, 2010). Inoltre il primo cambiamento nella componente nervosa è di tipo strutturale, con alterazione dell'assoglia e della porzione distale del nervo ottico e successivamente si hanno le aberrazioni neuronali sopracitate riferimento (Nicolàs Cuenca, 2014).

Apoptosi neuronale

Una delle tecniche usate per lo studio della morte neuronale è il test TUNEL (transferasi deossinucleotide terminale), in cui si valuta la positività delle cellule all'attivazione dell'enzima, il quale aggiungendo deossinucleotidi terminali al DNA causa rotture della doppia elica con conseguente disfunzione cellulare e morte. Da questo test fatto su retine di ratti diabetici STZ-indotti dopo un mese, è emerso che la maggior parte delle cellule TUNEL-positivo non sono cellule co-localizzate con cellule endoteliali, ma si tratta di neuroni e cellule gliali; similmente l'aumento di morte cellulare è stato trovato anche in retine postmortem di pazienti diabetici (Barber, (2003)). L'aumento dell'apoptosi neuronale, indica che il diabete induce una neurodegenerazione cronica nella retina (Barber, (2003)). La perdita delle cellule ganglionari si riflette anche sulla perdita del

numero di assoni del nervo ottico e ciò si ripercuote sull'alterazione del trasporto retrogrado, nel nervo ottico, con conseguente perdita funzionale già nelle prime settimane dell'induzione al diabete (Barber, (2003); M. SCOTT, 1986,; J M Lopes de Faria, 2002;) Recenti studi di OCT, eseguiti in vivo su pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1, hanno rivelato che lo strato interno della retina è quello che soffre di più. Gli studi condotti con indagine OCT permettono di misurare in vivo gli spessori dei vari strati retinici, mediante analisi d'immagine e algoritmi. Anche da questi studi si conferma l'ipotesi che si ha morte dei neuroni retinici, in particolare delle cellule ganglionari, in quanto gli strati della retina interna hanno una riduzione dell'ispessimento significativa rispetto allo strato esterno, avvalorando ancora una volta l'ipotesi che la perdita funzionale retinica è data dalla neurodegenerazione, evento che precede le manifestazioni cliniche di tipo vascolare (Alistair J. Barber T. W., 2011, ; Hille W. van Dijk, 2009). Inoltre ci sono evidenze che la morte dei neuroni e della glia avviene per apoptosi, infatti si osserva un aumento dei livelli di Bax, molecola pro-apoptotica, nelle cellule TUNEL-positive, suggerendo che l'iperglicemia induce la morte cellulare per apoptosi (Barber, (2003); Francesca Podesta', 2000,). Non solo Bax, i cui livelli aumentano, è indice di morte per apoptosi delle cellule neuronali, ma studi di immunohistochimica, eseguiti su retine sperimentali diabetiche, hanno rivelato anche l'aumento di caspasi-3 e caspasi-9 nelle CGR rispetto alle retine di controllo (Kern T. S., 2008.). La perdita delle CGR è accompagnata con la riduzione dell'ispessimento dello strato plessiforme interno (Kern T. S., 2008.). Nella neurodegenerazione molti neuroni muoiono per apoptosi, ma tanti altri sopravvivono in modo aberrante, contribuendo alla disfunzione.

Quali sono i meccanismi che determinano apoptosi neuronale?

Non si conoscono con chiarezza quali sono tutti i meccanismi che portano alla morte neuronale nella retina diabetica, ma sicuramente tutti i processi biochimici alterati, precedentemente descritti, hanno un ruolo, in quanto causano l'aumento degli AGEs e dello OS. Oltre all'alterazione di questi processi, si manifestano anche altri tipi di squilibri, come l'alterazione del glutammato e la mancanza del supporto trofico, fornito da alcuni fattori, come l'insulina.

Ecitotossicità del glutammato

Gli elevati livelli di glutammato nel vitreo di pazienti diabetici, sono il segno dell'alterazione dell'omeostasi del suo metabolismo. Tra i fattori responsabili di tale aumento c'è la riduzione

della capacità retinica di ossidare il glutammato a glutammina a causa della riduzione dell'enzima glutammina sintetasi (Alistair J. Barber T. W., 2011,), inoltre le cellule di Muller, non riescono ad assicurare il giusto uptake degli elevati livelli di glutammato. Le alte concentrazioni di glutammato extracellulare sono responsabili di ecitotossicità, in quanto essendo un neurotrasmettitore stimola costantemente i neuroni postsinaptici, bloccando la corretta neurotrasmissione del segnale visivo; ciò determina alterazioni visive (Simó, 2012). Le cellule più suscettibili all'ecitotossicità del glutammato sono le CGR, perché hanno maggiore espressione dei recettori NMDA per il glutammato, espressione che è deregolata (sovr-espressione) dalle condizioni di HG (Alistair J. Barber T. W., 2011, ; Simó, 2012). La continua stimolazione dei neuroni postsinaptici crea continua depolarizzazione che porta a morte cellulare per apoptosi (Barber, (2003)). L'apoptosi neuronale potrebbe essere un meccanismo compensatorio con la finalità di proteggere i neuroni dall'eccessiva stimolazione da parte del glutammato e quindi limitare i danni a livello locale (Alistair J. Barber T. W., 2011,) (Fig.16).

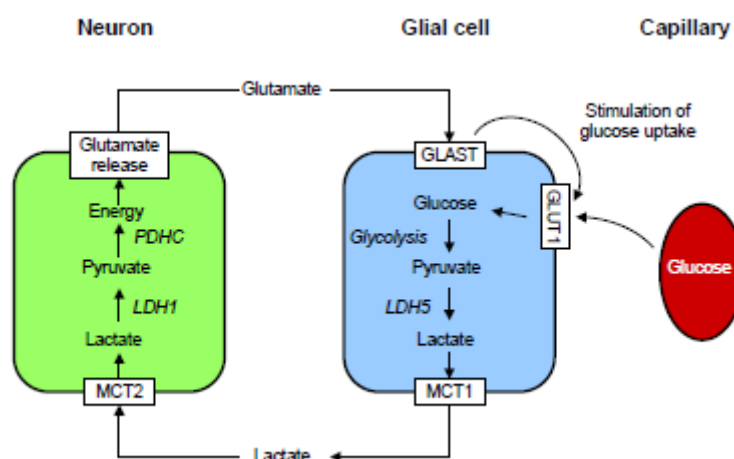


Figura 16. Ecitotossicità del glutammato. Tratto da Osborne et. al 2004.

Mancanza di supporto trofico

L'altra ipotesi, che porterebbe all'apoptosi neuronale, è la riduzione nella retina diabetica dell'abbondanza dei fattori trofici e delle segnalazioni dei fattori di crescita che risultano essenziali per la sopravvivenza dei neuroni, dei periciti e delle cellule endoteliali (Alistair J. Barber T. W., 2011,). Somministrando infatti il fattore di crescita nervoso NGF, si ottiene riduzione dell'apoptosi (Hans-Peter Hammes, 1995.). E' stato dimostrato che l'insulina ha azione neurotrofica (Will Whitmire, 2011;), avendo un'importante influenza sulla sopravvivenza della neuroretina, infatti il tessuto retinico ha un'abbondanza di recettori per l'insulina (IRS-2). Questi hanno un'alta attività

basale, capace di legare le basse concentrazioni fisiologiche di tale ormone (Alistair J. Barber T. W., 2011,). L'insulina legandosi ai suoi recettori (IRS-2), attiva la via di segnalazione che coinvolge PI-3K/Akt, la cui risposta cellulare è la sopravvivenza neuronale (Chad E.N. Reiter, 2006.). Considerando ciò, è plausibile affermare che la riduzione dei recettori IRS-2 nella retina diabetica, come anche la distruzione delle cellule beta del pancreas, contribuiscono alla neurodegenerazione retinica (Chad E.N. Reiter, 2006.).

Un grande contributo all'apoptosi neuronale è dato dallo OS e dall'accumulo di AGEs. Lo OS porta ad apoptosi, si vede che nelle colture di CGR, in cui si riproduce lo OS con H₂O₂, si ha aumento della morte neuronale per apoptosi all'aumento delle specie ossidanti. Anche gli AGEs sono causa di neurodegenerazione, come visto precedentemente gli AGEs interagiscono con i recettori RAGE dalla quale interazione tra le risposte cellulari, si hanno: aumento della eNOS-sintasi, risposte pro-infiammatorie e ciò porta a morte cellulare per apoptosi, con particolare suscettibilità dei CGR che sovraesprimono AGEs.

Attivazione della microglia

La microglia retinica, è costituita da due tipi cellulari, le cellule di Muller, specifiche della retina e predominanti, e gli astrociti; la disfunzione gliale, intesa come attivazione della microglia, è la seconda componente, dopo l'apoptosi neuronale, della neurodegenerazione retinica (Barber, (2003)). L'obiettivo dell'attivazione gliale, sarebbe quello di riparare la retina dai vari danni indotti dall'iperglicemia (Will Whitmire, 2011;). Fanno parte dell'attivazione gliale cambiamenti specifici dei due tipi cellulari costituenti. Tra questi cambiamenti il più caratteristico è l'aumento dei livelli basali della proteina fibrillare gliale acida (GFAP), tale aumento è indice sensibile della neurodegenerazione perché è l'elemento comune con le malattie neurodegenerative del SNC (Barber, (2003); Szabadfi, Neuropeptides, Trophic Factors,, 2014). L'aumento dei livelli di GFAP è una risposta alle lesioni retinali e ischemiche ed è stato osservato che si presenta nelle retine sperimentali di ratti diabetici. Un aspetto interessante è la differente risposta delle cellule di Muller e degli astrociti all'insulto iperglicemico, infatti la GFAP aumenta la propria concentrazione solo nelle cellule di Muller e questo incremento è preceduto da un decremento dell'espressione negli astrociti (Barber, (2003)). Inoltre la partecipazione dell'attivazione gliale nella neurodegenerazione retinica è data anche dalla riduzione della glutammina sintetasi nelle cellule

di Muller che porta ad aumento di glutammato (Szabadfi, Neuropeptides, Trophic Factors,, 2014), che come visto precedentemente, causa ecitotossicità. La degenerazione neuronale indotta dall'attivazione della glia è ottenuta anche perché essa in condizioni di HG rilascia molecole infiammatorie come citochine, molecole citotossiche quali TNF α e ROS che conducono a morte neuronale e ci sono evidenze che le cellule di Muller rilasciano VEGF (Krisztina Szabadfi E. P., 2014).

Finora sono stati descritti eventi con cui la microglia partecipa direttamente alla neurodegenerazione, ma essa partecipa anche indirettamente. Dato che la microglia è importante per dare sostegno ai neuroni retinici, ad esempio le cellule di Muller metabolizzano il glucosio per fornire direttamente il piruvato e il lattato alle CGR e svolgono l'uptake del glutammato, la disfunzione si ripercuote necessariamente sui neuroni; in particolare essendo la glia importante per la corretta omeostasi del tessuto retinico, se subisce alterazioni funzionali, con particolare riferimento alla neuroretina, perde l'armonia omeostatica e va incontro a neurodegenerazione.

1.2.5. Interazione neurovascolare

Alla luce di quanto detto si deduce che la visione più corretta della fisiologia retinica, è quella che focalizza l'attenzione sul fatto che questo tessuto è costituito sia da una componente vascolare e sia da una componente nervosa ed esiste un'alta interazione sinergica tra le due che rende la retina perfettamente funzionante e adattabile alle diverse condizioni fisiologiche che si presentano. Si parla dunque di *unità neurovascolare*, essa è la dimostrazione dell'accoppiamento tra attività neuronale e vascolare, la microglia infatti mediante molecole vasoattive controlla il microcircolo e garantisce che la vascolarizzazione retinica risponda in modo appropriato all'esigenza dei neuroni; nel momento in cui vi sono cambiamenti nell'attività neuronale si ottengono modifiche del metabolismo, del flusso sanguigno e della densità capillare (Timothy S. Kern¹, 2014). L'integrazione funzionale tra neuroni e cellule vascolari è clinicamente evidente dal fatto che in condizioni di iperossia si realizza vasocostrizione, al contrario in condizioni di ipercapnia si ha vasodilatazione (Mitsuo Kato, 2013). È quindi chiaro che quando si realizzano le disfunzioni sopradescritte, si ottiene alterazione dell'unità neurovascolare e la retina si adatta negativamente all'insulto iperglicemico andando incontro a perdita di funzione. La comunicazione neurovascolare si realizza in vari modi, tra cui il rilascio di molecole vasoattive da parte delle cellule neurogliali, per regolare il flusso sanguigno in funzione all'attività neuronale. Vengono rilasciati fattori come: H⁺, K⁺, ossido NO (ossido nitrico), adenosine, neurotrasmettitori; questi sono segnali che hanno azioni

rapide, mentre altre molecole, come i fattori di crescita hanno effetti prolungati nel tempo (Kern T. S., 2014;).

Ci sono evidenze che nel diabete esiste l'alterazione della comunicazione neurovascolare (Kern T. S., 2014;). L'NO è un vasodilatatore rilasciato dalle cellule neurogliali per comunicare con il sistema vascolare retinico; nel siero di pazienti diabetici i livelli dei prodotti di degradazione dell'NO (nitrati e nitriti) sono più alti rispetto ai livelli plasmatici dei pazienti non diabetici (Kern T. S., 2014;). Nonostante ciò, la biodisponibilità di NO decrementa, in quanto c'è un aumento dei radicali liberi che interagendo con i prodotti dell'NO, ne riducono la sua biodisponibilità (Kern T. S., 2014;). L'altro aspetto fondamentale che sostiene fortemente l'ipotesi secondo cui la neurodegenerazione si stabilisce precocemente e porta successivamente alla vasculopatia, è l'alterazione nel rilascio di uno dei fattori partecipe alla comunicazione neurovascolare. Si tratta del VEGF, il fattore di crescita endoteliale vascolare che ha molteplici effetti sul sistema vascolare e ne risulta fortemente compromessa sia l'espressione e sia il rilascio nella retina diabetica. Del VEGF esistono varie forme che si legano a vari recettori con attività tirosina chinasi (Will Whitmire, 2011;). VEGF-A noto come VEGF è la forma più caratteristica nella DR, in quanto è responsabile dell'angiogenesi e della permeabilità vascolare, aumentandola. Esso si lega al recettore VEGFR-1 e VEGFR-2, ed è prodotto da RPE, cellule endoteliali, periciti, astrociti, cellule di Muller, cellule amacrine, cellule ganglionari. VEGF-A ha una funzione meno caratterizzata, ma è comunque legata all'angiogenesi, alla permeabilità vascolare e forse è importante per la sopravvivenza cellulare; si lega al recettore VEGFR-1 ed è espresso nel cristallino, nel vitreo, nell'iride e nella retina di occhi non diabetici (Will Whitmire, 2011;). Gli aumentati livelli di questo fattore di crescita nella retina negli occhi di pazienti e di roditori diabetici sperimentali, sono responsabili dei danni vascolari, per cui molte terapie convenzionali, mirano a usare molecole che riducono il VEGF. Come vedremo in seguito, in realtà il VEGF ha anche un ruolo neuroprotettivo. La regressione delle cellule vascolari può essere interpretata come la diretta conseguenza dell'alterazione dei neuroni, confermando che la neurodegenerazione conduce ai danni vascolari caratteristici degli stadi clinici della DR (Alistair J. Barber T. W., 2011,). È necessario continuare con la ricerca dei meccanismi esatti con cui la neurodegenerazione si realizza e progredisce verso la vasculopatia (Fig.17).

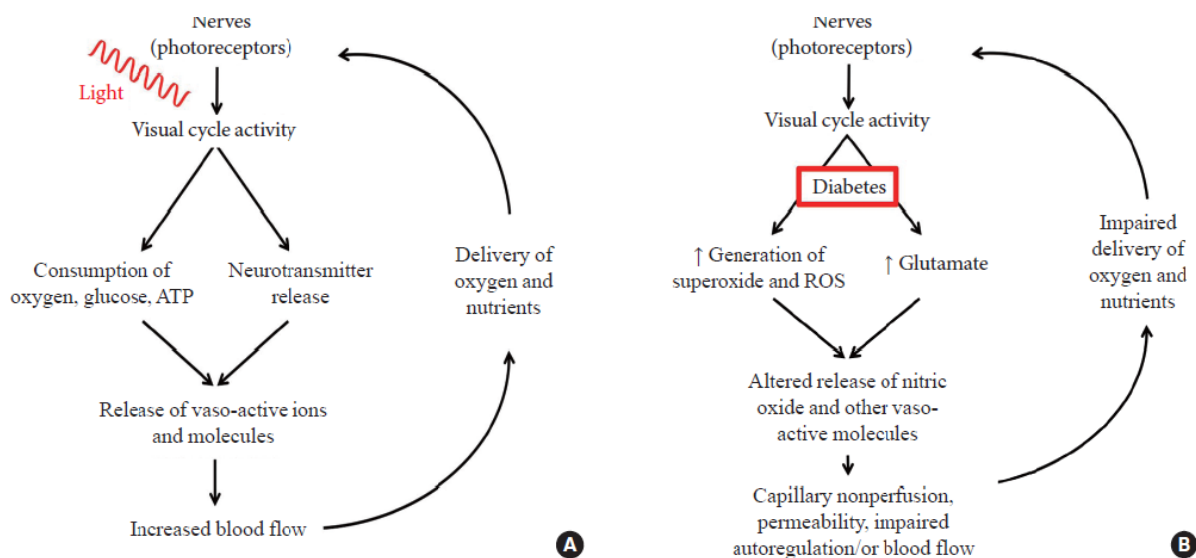


Figura 17. Interazione neurovascolare. Tratto da Kern et. al 2014.

1.2.6. Possibilità di prevenire la DR : neuroprotezione

1.2.6.1. Trattamenti terapeutici applicati oggi

Se l'iperglicemia è causa degli eventi patogenetici della DR, anche l'ipertensione, a causa dell'aumento del flusso sanguigno e dei danni meccanici dati alle cellule endoteliali, che determina aumento del rilascio del VEGF, è un fattore di rischio per lo sviluppo della DR. Per tale motivo lo stretto controllo dei livelli ematici di glicemia e della pressione arteriosa aiutano a prevenire lo sviluppo e la progressione della DR (Cheung N, 2010; Simó, 2012); quando però, si presentano le prime manifestazioni cliniche della DR a causa della "memoria biologica" ridurre i livelli di glucosio nel sangue non è efficace, perché le cellule hanno già subito dei cambiamenti epigenetici secondo i quali continueranno con le disfunzioni indotte dall'iperglicemia. Nel momento in cui il paziente è affetto da NPDR o PDR è necessario intervenire con approcci terapeutici più mirati e in alcuni casi si rende necessario l'approccio chirurgico. La fotocoagulazione laser è la terapia oftalmica più usata per la cura della DR. Consiste nel mandare un flash laser nei punti della retina in cui sono presenti le lesioni vascolari, per "bruciare" e limitare a quella zona il danno (Cheung N, 2010). Quando la patologia è molto avanzata la visione ha serie compromissioni per la presenza di emorragie nel vitreo e distacco della retina dalla coppa ottica rendendo necessario il trattamento con dei veri e propri interventi di chirurgia oftalmica, come la vitrectomia. Tutti questi interventi descritti sono trattamenti invasivi, per cui sarebbe sempre meglio evitarli. Grazie alle conoscenze patogenetiche acquisite nel corso degli anni riguardo alla patogenesi della DR, si applicano

trattamenti farmacologici mirati e meno invasivi, ma come vedremo sono concepiti nella visione errata della DR, per cui comportano effetti collaterali importanti e risultati non ottimali. Tra i trattamenti farmacologici più usati oggi, ci sono quelli atti a ridurre i livelli di VEGF, sono i così noti farmaci anti-VEGF, la cui approvazione di uso è stata data dalla US Food and Drug Administration (Durham JT, 2011.). L'idea di usare questo tipo di trattamento farmacologico nasce dall'osservazione degli alti livelli di VEGF presenti nel vitreo e nella retina dei pazienti affetti da DR e dalla conoscenza che questo fattore di crescita spinge la situazione patologica verso l'edema maculare e negli stadi sempre più avanzati, come la fase PDR. Bevacizumab (Avastin), ad esempio, è un farmaco anti-VEGF usato, si tratta di Mab (anticorpo monoclonale) prodotto dalla Genetech, capace mediante iniezioni intra-vitreali (per evitare che il farmaco entri nel circolo sistemico), di sequestrare tutte le forme di VEGF (Durham JT, 2011.). Esistono vari limiti all'utilizzo di tale approccio terapeutico, innanzitutto nel momento in cui c'è l'interruzione del trattamento riprende la progressione patologica con neovascolarizzazione e distacco della retina dalla cupola ottica, diventa così necessario il trattamento coadiuvante fotocoagulativo, selettivo alle aree interessate della retina, per evitare ulteriori trattamenti. (Durham JT, 2011.). Inoltre l'efficacia parziale della terapia è data dal fatto che c'è la produzione di altre molecole neo-angiogeniche come l'angiopoietina-1, il PDGF e l'eritropoietina (Cheung N, 2010). Ci sono limiti alle terapie anti-VEGF legate anche al fatto che gli agenti anti-VEGF entrano nella circolazione sistemica causando ipertensione e malattie cardiovascolari ischemiche (Simó, 2012). Sebbene la terapia anti-VEGF sembra essere curativa, gli effetti a lungo termine sono ancora da stabilire, inoltre si riscontrano anche effetti avversi per la somministrazione locale ripetuta, come cataratta, distacco della retina, emorragie vitreali, infezioni e perdita di cellule nervose (Cheung N, 2010; Simó, 2012). L'aspetto più interessante riguarda però l'azione trofica del VEGF per le cellule endoteliali e neuronali in condizioni fisiologiche (Magali Saint-Geniez A. S., 2008). Nonostante VEGF sia un fattore di crescita molto discusso per il suo effetto negativo nella patogenesi della DR, ci sono evidenze che sia in realtà un fattore neurotrofico con effetti neuroprotettivi. Esso ha infatti un ruolo endogeno importante nel mantenimento della funzionalità della neuroretina (Magali Saint-Geniez A. S., 2008). Oltre ad essere particolarmente importante durante lo sviluppo, per la crescita vascolare e per le risposte cellulari agli insulti ipossici, è prodotto anche nella retina adulta. L'RPE e le cellule ganglionari producono VEGF che ha azione autocrina anche sulle cellule non vascolari; inoltre il recettore VEGFR-2 è costitutivamente attivo ed è espresso anche dai fotorecettori e dalle cellule di Muller; la presenza del recettore in questi due tipi cellulari è la

dimostrazione dell'interazione paracrina attraverso cui VEGF invia segnali neurotrofici per la sopravvivenza neuronale (Magali Saint-Geniez A. S., 20098). Trattamenti che riducono i livelli di VEGF hanno portato a un aumento della morte cellulare nell'INL e nell'ONL (Magali Saint-Geniez A. S., 2008). Tutti questi elementi convergono a supporto dell'ipotesi che VEGF gioca un ruolo nell'omeostasi e nella protezione della funzione della retina adulta. Si può dunque affermare che questo fattore di crescita ha due ruoli nella neuroretina: sostenere la neovascolarizzazione per fronteggiare l'ipossia e ridurre l'apoptosi neuronale (Barber, (2003)).

Altre strategie terapeutiche sono mirate verso gli altri due aspetti caratterizzanti la patogenesi della DR, OS e infiammazione. Contro lo OS si può intervenire con l'utilizzo di antiossidanti, come ad esempio la luteina. L'utilizzo della luteina ha mostrato miglioramento nell'ERG e prevenzione nella perdita di RCG, grazie al fatto che riduce la produzione di ROS e quindi l'attivazione della caspasi-3 (molecola pro-apoptotica) (Tsubota, 2010). Si cerca di intervenire fronteggiando anche contro l'infiammazione facendo uso di farmaci antinfiammatori. Sia nel caso dell'uso degli antiossidanti e sia nel caso degli antinfiammatori, non ci sono esiti completamente promettenti. Per quanto riguarda l'uso di antinfiammatori si riscontrano gli stessi effetti collaterali riscontrati nelle terapie anti-VEGF, provenienti dalle somministrazioni intra- vitreali ripetute; mentre per quanto riguarda il trattamento con antiossidanti, ci sono risultati controversi.

1.2.6.2. Strategia neuroprotettiva

Sulla base dei grossi limiti delle terapie convenzionali sopracitate e considerando le nuove conoscenze maturate sui meccanismi patogenetici più nascosti della DR, ovvero classificandola come malattia neurodegenerativa è interessante applicare nuove strategie terapeutiche. L'approccio terapeutico ideale da adottare, sarebbe la prevenzione allo sviluppo delle lesioni vascolari; alla luce di quanto chiarito finora sono molte le linee di ricerca che saggiavano possibili molecole neuroprotettive in modo da proteggere la neuroretina per evitare che la neurodegenerazione faccia progredire la malattia verso le lesioni vascolari. Nell'attuazione di una terapia neuroprotettiva è importante intervenire nella finestra di tempo che intercorre tra l'inizio dei deficit funzionali e l'insorgenza del danno vascolare retinico, per cui è importante anche lo studio di nuove strategie diagnostiche capaci di rivelare alterazioni funzionali della neuroretina in pazienti diabetici che ancora non mostrano alcun segno clinico di danno vascolare alla retina.

Considerando che tra le disfunzioni determinanti la neurodegenerazione c'è l'alterazione dell'equilibrio tra fattori neurotossici e neuroprotettivi, molta attenzione è data ai fattori neurotrofici sintetizzati dalla retina in condizioni fisiologiche, come possibile trattamento neuroprotettivo (Simó, 2012).

Fattori neurotrofici

Sono vari i fattori neurotrofici candidati nell'applicazione di interventi neuroprotettivi per la prevenzione della DR, in quanto hanno dimostrato effetti benefici sulla sopravvivenza neuroretinale dopo lesioni indotte da iperglicemia e ischemia (Neville N. Osborne*, 2004). PEDF è uno dei fattori neurotrofici di cui si conoscono le proprietà neuroprotettive; oltre ad essere un inibitore dell'angiogenesi (è downregolato nella DR) promuove l'aumento della glutammina sintetasi nelle fasi precoci della DR sperimentale, permettendo la riduzione dell'ecitotossicità del glutammato (Simó, 2012). L'aumento di PEDF nella neuroretina a seguito di lesioni da riperfusione ischemica ed eccessiva esposizione alla luce, ha l'obiettivo di favorire la sopravvivenza cellulare, questo è indice che si tratta di un fattore neuroprotettivo (Simó, 2012). Ciò suggerisce che potrebbe essere un possibile target terapeutico, ma ancora non è stata saggiata la sua azione neuroprotettiva in modelli diabetici sperimentali. Ci sono evidenze che NGF, il fattore di crescita nervoso, risulta downregolato insieme al suo recettore TrkA nella retina diabetica e la somministrazione locale di questo fattore sembra essere protettivo nei confronti della morte delle cellule ganglionari (Hans-Peter Hammes, 1995.; Valeria Colafrancesco, 2011); risulta quindi anche NGF un possibile target terapeutico.

Peptidi neuroprotettivi

Negli ultimi anni molto interesse si sta concentrando sull'azione dei neuropeptidi espressi fisiologicamente dalla retina adulta. Sono stati identificati 20 neuropeptidi (Gábríel, 2013) e per alcuni di questi ci sono buone evidenze per l'applicazione nei trattamenti neuroprotettivi nella prevenzione dello sviluppo delle complicazioni della DR. I peptidi per i quali è stata definita l'azione neuroprotettiva sono: angiotensina II (AT), cortistatina (Cst), neuropeptideY (NPY), somatostatina, peptide attivatore dell'adenilato ciclasi della ghiandola pituitaria (PACAP), sostanza P e polipeptide vasoattivo intestinale (VIP) (Gábríel, 2013).

NPY è stato trovato nelle cellule amacrine e nelle RCG, ma anche in cellule non neuronali come cellule endoteliali, cellule di Muller e microglia (Gábríel, 2013). L'azione fisiologica di NPY è l'inibizione, attraverso il legame ai suoi recettori Y1-4-5, dell'aumento del Ca^{2+} intracellulare a seguito di stimoli depolarizzanti (Gábríel, 2013). Le sue proprietà neuroprotettive sono state saggiate in retina di ratto e i risultati di questi esperimenti suggeriscono che NPY protegga la neuroretina dall'ecitotossicità del glutammato Trovare Santos 2013.

I due peptidi con azione neuroprotettiva che suscitano maggiore interesse sono però la somatostatina e PACAP.

Somatostatina

La somatostatina, peptide ipotalamico, venne identificata inizialmente come antagonista del recettore per il GH (ormone della crescita), inibizione che ha effetti antiangiogenici (G. Casini E. C., 2005; Szabadfi, 2014); si tratta di un neuropeptide ampiamente distribuito nel SNC periferico, successivamente si comprese che SST ha azioni biologiche diverse (Szabadfi, 2014), distribuite anche in altri distretti corporei, per tale motivo sono iniziati gli studi su SST come possibile target terapeutico contro la DR che, è come ampiamente descritto, caratterizzata dalla neo-angiogenesi (Simó, 2012). Il neuropeptide risiede, oltre che nel SNC, anche nel tratto digerente e nella retina, insieme ad alcuni dei suoi diversi recettori (Simó, 2012). Nel tessuto retinico, SST è maggiormente localizzata nella popolazione delle cellule amacrine e in minore quantità anche nelle RCG (G. Casini E. C., 2005). L'espressione simultanea sia del peptide e sia dei suoi recettori (sst) indica un'azione autocrina e sembra avere un ruolo pleiotropico, infatti interagisce con diversi tipi del recettore sst(1-2-3-4-5) (Gábríel, 2013; Simó, 2012; Davide Cervia G. C., 2008). In particolare sst₂, che è il recettore maggiormente espresso nella retina, è localizzato nelle cellule amacrine, nelle cellule bipolari, nei fotorecettori e nell'RPE (Thermos, 2005; Davide Cervia G. C., 2008). SST è implicata nella neovascolarizzazione e nella neurodegenerazione della retina indotta dall'iperglicemia, si assiste infatti a un decremento dell'espressione di questo peptide nel fluido vitreale di pazienti con DR, rispetto a pazienti non affetti dalla patologia (Simó, 2012; G. Casini E. C., 2005; Szabadfi, 2014). SST risulta protettiva nei confronti della retina, sia nel ridurre la neovascolarizzazione e sia nella neuroprotezione. (Davide Cervia G. C., 2008). La somministrazione intravitreale di SST o di suoi analoghi protegge la retina dalla DME e dagli stadi più avanzati come PDR, mediante interazione con il recettore sst₂, che porta a protezione dei neuroni dall'apoptosi, proteggendoli

dal danno ischemico e dall'ecitotossicità del glutammato (G. Casini E. C., 2005). SST ha anche un ruolo anti-angiogenico come già detto, contribuendo all'omeostasi del tessuto e all'inibizione del rilascio dei fattori pro-angiogenici (G. Casini E. C., 2005; Davide Cervia G. C., 2008). Risulta quindi chiaro che sono due i ruoli di SST e dei suoi analoghi sintetici con cui partecipa alla protezione della retina diabetica: sfavorisce l'angiogenesi e protegge i neuroni (Szabadfi, 2014; G. Casini E. C., 2005). È grazie a ciò che sono molti gli studi sull'eventuale applicazione di SST o di suoi analoghi, nella prevenzione della neurodegenerazione retinica in pazienti diabetici. In questo lavoro di tesi è stata data particolare attenzione alla possibile azione neuroprotettiva di un analogo sintetico della somatostatina, l'octreotide (OCT), esso è un agonista selettivo del recettore ss_{t2} che esercita neuroprotezione e ritarda l'avanzamento della DR (G. Casini E. C., 2005). Gli effetti benefici di OCT per alcuni dettagli sono migliori dell'SST, infatti se questa ha un'emivita breve, OCT e altri analoghi sintetici è eliminato più lentamente, quindi la sua azione risulta più efficace (Thermos, 2005). Sembrerebbe che SST e suoi analoghi, come appunto OCT, interagendo con ss_{t2} attiva una via di segnalazione che inibisce il rilascio di glutammato (G. Casini E. C., 2005). Ci sono evidenze che OCT deregola anche l'espressione di IGF-1 (fattore di crescita insulina-simile-1), altro fattore pro-angiogenico, e inibisce il rilascio di VEGF nei neuroni in condizioni ischemiche (G. Casini E. C., 2005). In definitiva si può affermare che SST o OCT possono essere utilizzati per la neuroprotezione. Sono stati ottenuti risultati promettenti in esperimenti in vitro e in vivo, in cui c'è stata la somministrazione topica di SST e di OCT che previene l'alterazione dell'ERG, l'attivazione gliale e l'apoptosi neuronale in ratti con diabete STZ-indotto; non solo per la neuroprotezione, ma anche per fronteggiare i danni vascolari della DR, come la neo-angiogenesi, SST o OCT sono dei target terapeutici promettenti.

PACAP adenilato ciclastasi della ghiandola pituitaria

PACAP è un peptide appartenente a una famiglia di fattori neurotrofici e neuroprotettivi, ha potenti capacità neuroprotettive ed effetti citoprotettivi, partecipa allo sviluppo neuronale e in malattie neurodegenerative come il Parkinson's (Szabadfi, 2014; Gabriel, 2008). È presente insieme ai suoi recettori (PAC1, VPAC2, VPAC2) in tutti gli strati della retina, tranne che nello strato dei fotorecettori (Krisztina Szabadfi E. P., 2014). Alcuni studi condotti su modelli animali in vivo, suggeriscono che PACAP è un retinoprotettivo, ovvero neuro-protegge la retina mediante l'inibizione delle vie di segnalazione pro-apoptotica e stimolazione delle vie di segnalazione anti-

apoptotiche (Gabriel, 2008; Aliz Szabo, 2012). Esso è infatti capace di attenuare i danni retinici indotti dall'ischemia, dall'ecitotossicità e da altre perturbazioni che inducono degenerazione retinica (Szabadfi, 2014). Molte linee di ricerca mettono in risalto il possibile utilizzo di PACAP come trattamento neuroprotettivo, in quanto è capace di neuro-proteggere la retina e di inibire la neovascolarizzazione retinica indotta dall'iperglicemia in vitro (Szabadfi, 2014). Negli esperimenti in cui colture cellulari sono esposte ad alto glucosio (HG), si osserva l'over-espressione dei recettori di PAC1-R, mostrando azione anti-proliferativa (Alessandro Castorina, 2010). Inoltre ci sono evidenze che PACAP previene la neurodegenerazione, inibendo l'apoptosi delle cellule amacrine, cellule di Muller, RCG, fotorecettori, bipolari e orizzontali; la protezione di PACAP sembra essere esplicata con il mantenimento della BRB, che nella DR si rompe, e con la stimolazione all'aumento dei fattori anti-apoptotici (Krisztina Szabadfi E. P., 2014). Non sono ben conosciuti i meccanismi coinvolti nell'azione di PACAP, ma sembra che siano incluse la via delle MAPk (chinasi attivato da mitogeno), via Akt e citochine e chemochine; questi fattori giocano ruoli importanti, di sopravvivenza, nella protezione a seguito di lesioni ischemiche (Aliz Szabo, 2012; Szabadfi, 2014). Altri effetti citoprotettivi di PACAP coinvolgono, attraverso l'attivazione di PAC1-R, il blocco dell'attivazione delle caspasi. Altri studi hanno evidenziato che PACAP protegge la retina sovra-esprimendo tutti e tre i suoi tipi recettoriali, nonostante la maggior attivazione di PAC1-R (Szabadfi, 2014). Tutti questi dati suggeriscono che andare avanti con gli studi sulla possibile applicazione terapeutica di PACAP, nella prevenzione dello sviluppo e progressione della DR , potrebbe avere risvolti molto positivi.

1.3. Modello sperimentale

Lo studio sperimentale delle patologie richiede sistemi su cui è possibile ricreare le condizioni fisiologiche e patologiche utili alla comprensione dei meccanismi patogenetici e alla possibilità di saggiare i vari approcci terapeutici per la risoluzione patologica. Questi sistemi sono detti modelli sperimentali e si distinguono in funzione alla complessità del sistema : modelli in vivo, modelli in vitro e modelli in silico.

1.3.1. Modello in vivo

I modelli in vivo sono rappresentati da sistemi animali vivi su cui si studiano meccanismi fisiologici e patologici e possibili target terapeutici, analizzando nel complesso le risposte dell'animale, mediante tecniche sofisticate. Per quanto riguarda lo studio della DR, i modelli animali più utilizzati sono i roditori, in particolare topi e ratti. Si tratta di mammiferi, quindi molto simili all'uomo per la complessità. La retina dei roditori ha la stessa struttura di quella umana, la differenza è il colore della sclera, nero per i roditori, e la vascolarizzazione della retina interna è centripeta a differenza di quella umana che è centrifuga. Per lo studio della DR, al modello animale in vivo, oggetto di studio, si induce primariamente il diabete, solitamente il diabete mellito di tipo 1. L'induzione al diabete è maggiormente compiuta mediante il trattamento chimico del modello con streptozotocina STZ (Remya Robinson, 2012), la quale determina morte delle cellule β -pancreatiche (produttrici di insulina); la privazione nell'organismo di insulina instaura una condizione di iperglicemia, andando così verso il diabete di tipo 1, ottenendo non solo i cambiamenti vascolari della NPDR ma anche le precoci alterazioni biochimiche e fisiologiche che interessano neuroni e glia, dopo 1-2 mesi dall'inizio dell'iperglicemia (Remya Robinson, 2012). Questo tipo di tecnica è usato per i ratti, perché risultano più resistenti a tale trattamento. Altri modelli in vivo sono rappresentati da ratti e topi che spontaneamente diventano diabetici; possono sviluppare il diabete di tipo 1 o di tipo 2 ad un certo periodo dalla nascita, a seconda del ceppo; Zucker diabetic fatty rats, ad esempio, è un modello di ratto che sviluppa spontaneamente il diabete a 6-7 settimane dalla nascita, ma esistono anche altri ceppi diabetici spontanei (Remya Robinson, 2012). Tra i modelli di topo diabetici spontanei menzioniamo i Non obese- diabetic mice, db/db mice e $Ins2^{Akita}$ mice; questi ultimi due ceppi sono i modelli più usati. Db/db mice presenta una mutazione nel gene per il recettore della leptina, la quale è un ormone implicato nella regolazione del bilancio energetico; mentre gli $Ins2^{Akita}$ mice hanno una mutazione puntiforme per il gene dell'insulina2. È possibile applicare anche pancreatocomia chirurgica (Remya Robinson, 2012). Recentemente grazie alla buona prestazione del topo alla transgenesi, si usano ceppi di topi derivanti da progenitori in cui sono state applicate tecniche di transgenesi tessuto specifica o knockout genici, per cui le mutazioni indotte rendono questi animali diabetici, evitando così i vari trattamenti chimici i quali possono creare anche fenomeni di neurotossicità. Inoltre si possono utilizzare roditori che sovraesprimono il VEGF nei fotorecettori, l'utilità di questo ceppo è data dal fatto che a causa della breve vita di questi animali è difficile riprodurre le situazioni di PDR, caratterizzata da neovascolarizzazione e distacco della retina. Ancora più vantaggioso è l'utilizzo del ceppo Akimba, sviluppato recentemente, si tratta di un ceppo derivante

dall'incrocio tra Akita mice (ceppo diabetico spontaneo) e Kimba (ceppo che sovraesprime VEGF). Il ceppo, mostrando entrambe le caratteristiche parentali, sviluppa nel suo ciclo vitale le caratteristiche della PDR, mostrando quindi le lesioni vascolari avanzate della DR, come neovascolarizzazione della macula e distacco della retina dalla cupola ottica (Remya Robinson, 2012; Elizabeth P. Rakoczy, 2010). È interessante sottolineare che per lo studio della neovascolarizzazione retinica è molto soddisfacente l'uso del modello OIR (oxygen retinopathy induced). OIR è un modello murino sviluppato per lo studio della ROP (retinopatia nel prematuro), si tratta di topi che sviluppano proliferazione vascolare retinica e quindi tutte le caratteristiche della PDR, a seguito di un trattamento in cui gioca un ruolo fondamentale l'età del topo e i livelli di ossigeno. Topi PD7 (al settimo giorno dalla nascita), grazie al fatto che non hanno completato la vascolarizzazione retinica, sono incubati in condizioni di iperossia (75% di O₂) per cinque giorni, l'iperossia porta al blocco della vascolarizzazione retinica, in quanto il tessuto non sente la necessità di aumentare l'apporto di O₂. Successivamente la condizione normossica ambientale a cui sono rimessi gli animali, è percepita come ipossia dal tessuto, quindi inizia una neovascolarizzazione retinica imponente che risulta fallimentare, si instaura così la condizione patologica della retinopatia proliferativa che simula la ROP ma anche la fase PDR della DR. **REFERENZA** Smith.

L'uso dei roditori come modello in vivo per lo studio della DR ha notevoli vantaggi, oltre alla possibilità di effettuare tecniche transgeniche nei topi, si tratta di mammiferi che hanno un'alta omologia genetica con l'uomo, ciò permette di simulare al meglio i meccanismi molecolari e fisiologici riscontrati nell'uomo; si tratta di animali di piccola taglia, quindi facilmente manipolabili, sono poco costosi e un grande vantaggio è dato dal loro breve ciclo riproduttivo (Remya Robinson, 2012). Tuttavia ci sono limiti riscontrabili, seppure hanno una complessità fisiologica vicina a quella dell'uomo non si ha riproduzione identica al 100% dei fenomeni fisiologici e patologici che si riscontrano nell'uomo. Inoltre se è possibile riprodurre facilmente le fasi precoci della DR diventa più difficile ricreare le fasi avanzate, probabilmente per la durata breve della vita di questi animali (circa 1-2 anni), ma come visto precedentemente alcune strategie possono deviare in parte questo ostacolo (Remya Robinson, 2012).

Considerato questi limiti e gli inevitabili problemi etici, sono stati sviluppati anche modelli in vitro per studiare la DR.

1.3.2. Modelli in vitro

Nelle fasi iniziali dello studio sperimentale è necessario fare indagini preliminari con modelli di studio in vitro al fine di investire al meglio le risorse economiche e conoscere le basi molecolari dei processi fisiopatologici per il momento in cui lo studio si deve estendere in un contesto più globale e complesso, come quello dei modelli animali e dei successivi trials clinici eseguiti sull'uomo. Le colture cellulari sono un modello che permette la comprensione del comportamento delle singole popolazioni cellulari della retina in risposta all'insulto iperglicemico e permettono anche di saggiare molecole con potenziali terapeutici. Il modello in vitro è molto semplice e ha una grande versatilità sul controllo delle condizioni sperimentali oltre a fornire la possibilità di studiare singoli fenomeni per poi sommare tutto nei modelli in vivo. Le linee cellulari utilizzate sono per lo più RCG5, (una linea cellulare trasformata di ratto) rMC, RPE, HRMEC (cellule endoteliali vascolari retiniche); tali linee cellulari sono coltivate in condizioni di iperglicemia, OS o ipossia, comprendendo così le varie risposte cellulari alle complicazioni derivanti dal diabete. Alcuni studi hanno mostrato che l'esposizione delle RCG5 a condizioni di HG determina l'incremento del VEGF (Jiyan Hu, 2013). Inoltre le linee cellulari sono usate anche per studiare la morte cellulare nelle condizioni perturbanti, derivanti dall'iperglicemia, come l'HG, lo OS; le risposte osservate risultano essere gli incrementi dei livelli di mRNA di VEGF e l'induzione all'apoptosi. Non solo le RCG5, ma anche le rCM sia umane e sia murine, le RPE, HRMEC e le colture di periciti sono utilizzate per la comprensione delle risposte cellulari nella DR, i risultati variano a seconda del tipo cellulare ma si ha sempre aumento dell'espressione di VEGF, induzione all'apoptosi come risposte generali. Le stesse linee cellulari sono usate per saggiare possibili target terapeutici.

Lo studio in vitro ha molti vantaggi nell'applicazione preliminare di uno studio fisiopatologico, in quanto permette di curare i dettagli dei meccanismi patogenetici da molti punti di vista presi singolarmente. Tuttavia gli aspetti singoli restano isolati e diventa necessario lo studio su modelli che simulano tutti i fattori e le interazioni che entrano in gioco nell'organismo. L'utilizzo dei modelli in vivo è sicuramente quello che dà la visione più complessa e completa, ma l'altra possibilità in uno studio preliminare che vuole considerare la complessità tissutale, ma mantenere ancora un certo grado di semplicità è l'utilizzo dei modelli ex-vivo.

1.3.3. Modelli *ex-vivo*

Le colture organotipiche sono dei modelli *ex-vivo*, rappresentati dalle colture, all'esterno dell'organismo, di tessuto vivo, espianati dal modello animale. Il maggior vantaggio è dato dalla possibilità di applicare più metodi per l'analisi dettagliata che non è possibile applicare in vivo a causa della complessità (A.R. Caffè', 2001). La coltura organotipica è possibile realizzarla in quanto le caratteristiche morfologiche e fisiologiche del tessuto restano inalterate, se ricreate le condizioni fisiologiche-omeostatiche tipiche dell'organismo vivente. La retina di topo essere espianata può essere coltivata in vitro, superando così i problemi derivanti dalla complessità dell'intero organismo e aumentando invece la complessità di interazione dei vari fattori delle colture cellulari. Un limite a questo approccio può essere rappresentato dalla durata limitata del tessuto in coltura, ci sono evidenze che la retina di topo neonato può essere coltivata fino a 4 settimane (A.R. Caffè', 2001). Nelle colture organotipiche di retina, quest'ultima mantiene inalterate le caratteristiche istologiche, inoltre il comportamento fisiologico che si sviluppa è molto simile alla situazione in vivo (A.R. Caffè', 2001). Nonostante il limite dato dal tempo di coltura, grazie alla coltura organotipica si possono chiarire con relativa semplicità aspetti singoli di un meccanismo patogenetico, non trascurando l'omeostasi e quindi le interazioni tissutali, fondamentali nelle condizioni fisiologiche e patologiche. Da questi buoni propositi è stato tentato di mettere a punto un protocollo per colture *ex-vivo* di retina che mimassero le condizioni patologiche della DR.

Buoni sono stati i risultati ottenuti per la validazione di un modello *ex-vivo* di DR, dove è risultata fondamentale l'esposizione di retina espianata da topi sani alle condizioni iperglicemiche, allo OS (stress ossidativo) e alla presenza di AGEs, situazioni che compongono il quadro patologico della DR. Su questo modello *ex-vivo* di DR è possibile studiare i meccanismi patogenetici della malattia e saggiare alcuni target terapeutici, come ad esempio l'azione neuroprotettiva di neuropeptidi fisiologici.

2. Scopo della tesi

Lo scopo della tesi è quello di validare un modello ex-vivo di DR capace di ricreare gli stimoli perturbanti, caratteristici della DR. Risultati promettenti sono stati già ottenuti nel ricreare le condizioni di iperglicemia e di OS (stress ossidativo) in un tale modello; l'interesse del lavoro sperimentale è validare il modello ex-vivo di DR aggiungendo una terza condizione che ricrea un terzo elemento fondamentale nel meccanismo patogenetico, ovvero l'esposizione ad AGEs, i quali si accumulano nel tessuto con la condizione diabetica che persiste nel tempo. È possibile così valutare le risposte tissutali all'HG (alto glucosio), allo OS, che è un meccanismo unificante, e all'accumulo di AGEs. La validazione del modello sperimentale permette di analizzare le risposte tissutali per poter saggiare eventuali target terapeutici. L'altro scopo della tesi è infatti quello di verificare l'efficacia di molecole neuroprotettive, sulla base di risultati a supporto dell'ipotesi che la DR è primariamente una malattia neurodegenerativa. L'idea di neuro-proteggere la retina diabetica ha l'obiettivo di bloccare la progressione patologica verso la fase NPDR e PDR, dove si hanno lesioni vascolari retiniche da cui non si può più curare completamente la retina. I peptidi saggiati sono OCT e PACAP, ed è stata valutata l'efficacia neuroprotettiva sull'analisi di apoptosi cellulare ed espressione/rilascio di VEGF, dando attenzione alla correlazione di questi due fattori.

3. Materiali e metodi

3.1. Animali ed espianti di retina

Ogni esperimento è stato condotto su colture organotipiche di 4 frammenti di retina, espiantata da topi sani del ceppo C57BL/6. I topi di ambo i sessi e di un'età di 3/5 settimane, sono stati allevati in ambiente atmosferico controllato ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$; $50\pm 5\%$ di umidità) e con cicli luce/buio di 12h. Gli espianti sono stati eseguiti con topi anestetizzati con etere e sacrificati mediante dislocazione cervicale. Immediatamente all'escissione dell'occhio si sono effettuate le dissezioni retiniche in soluzione tampone fosfato con NaCl, sterile (PBS). Per la dissezione sono stati utilizzati ferri di microchirurgia oftalmica; effettuando un foro sul centro della pupilla è stata fatta un'incisione verticale con forbici oftalmiche e i due lembi liberi ottenuti hanno permesso di fare presa con pinzette e di esercitare trazione in direzioni opposte, delicatamente. Nell'eseguire questa leggera trazione la retina viene separata dalla parte esterna dell'occhio, formata da sclera e pigmentato. Il cristallino e l'umor vitreo sono stati rimossi, mentre l'umor acqueo è fuoriuscito inizialmente, grazie alla discontinuità della cornea. A questo punto è stato reciso il nervo ottico, che finora ha permesso di afferrare l'occhio senza pericolo di danno alla retina, quest'ultima è stata così isolata e orientata con la concavità rivolta verso l'alto. L'altro passo importante è stato l'incidere il tessuto in quattro parti simmetriche radialmente; ciò ha permesso di far stendere la retina. Le quattro incisioni sono state continuate fino a convergenza in modo da ottenere i quattro frammenti per la coltura ex-vivo.

3.2. Colture organotipiche ex-vivo

I frammenti retinici sono stati coltivati su membrane microporose (Millicell-CM colture inserts, Sigma) 0,4mm per 30mm, poste sul fondo di pozzetti di piastre 6-well sterili contenenti un 1ml di terreno di coltura, adeguato per ciascuna condizione di coltura. Gli espianti di retina sono stati adagiati sulle membrane microporose mediante l'uso di pipette Pasteur insieme ad una piccola quantità di volume, per evitare danni meccanici e permettere l'orientamento dei frammenti con il GCL rivolto verso l'alto, mediante l'utilizzo di pinzette da microchirurgia oftalmica. Il successivo

prelievo del volume iniziale ha permesso la distensione del frammento. Su ogni membrana sono stati adagiati dai 3 agli 8 frammenti per lo stesso trattamento. Le colture sono avvenute nell'incubatore a 37°C con 5% di CO₂. I terreni di coltura erano così composti: 50% di Modified Eagle Medium (MEM, Sigma), 25% PBS (tampone fosfato salino), 25% Hank's Salt Solution (Sigma), Penicillina 25 U/ml, Streptomicina 25 mg/ml, Amfotericina-B 1 µg/ml, L-glutamina 200µM, D-glucosio 6 mM. Le tre condizioni di coltura, per ricreare DR, sono: HG (alto glucosio), OS (stress ossidativo) con H₂O₂ e AGE. Per la condizione di HG sono stati aggiunti al terreno quantità di D-glucosio tali da raggiungere concentrazioni finali uguali a 45mM o 75mM. L'incubazione è durata da 1 a 10gg, sostituendo il terreno ogni 2gg. Lo OS è stato riprodotto mediante l'aggiunta al terreno di 1µM, 10µM e 100µM di H₂O₂, in questo caso la sostituzione del terreno è avvenuta ogni giorno, in quanto l'H₂O₂ è altamente instabile. Il terzo trattamento ha ricreato l'accumulo di AGEs nel tessuto; sono stati aggiunti al terreno 10µg/ml e 100 µg/ml di AGEs, sostituendo il terreno ogni due giorni; gli AGEs usati sono prodotti industrialmente dall'albumina di bovino.

I campioni coltivati in questo modo sono stati usati per le analisi molecolari e di immunoistochimica; con le analisi molecolari sono stati valutati i livelli di apoptosi mediante quantificazione di citocromo c con Western Blot e dei livelli di mRNA per caspasi-3-attiva e VEGF con Real Time PCR (RT-PCR). Le analisi sono state eseguite anche con tecniche di immunoistochimica per valutare quali popolazioni cellulari risultavano danneggiate e per comprendere l'entità del danno apoptotico. Inoltre i terreno raccolti al termine della coltura sono stati usati per valutare la quantità di VEGF rilasciato dal tessuto nel mezzo di incubazione, mediante saggio ELISA.

3.3. Trattamenti neuroprotettivi

I frammenti delle colture organotipiche di ogni condizione sono state trattate con neuropeptidi: OCT (1 µM) che è un analogo sintetico della SST e PACAP (0,1 µM). Inoltre sono stati trattati con una proteina chimerica che lega specificamente il VEGF, sequestrandolo: VEGF-trap (1ng/ml). Tali molecole farmacologiche sono state aggiunte al terreno di coltura. Ad ogni cambiamento di terreno questi trattamenti farmacologici sono stati aggiunti nuovamente al terreno fresco.

3.4. Preparazione delle sezioni retiniche

A seguito del periodo di incubazione gli espianti retinici destinati alla colorazione con DAPI e all'immunofluorescenza sono stati fissati con PAFA (paraformaldeide) al 4% in PB 0,1M per circa 90 minuti a temperatura ambiente. I campioni così fissati sono conservati per altri 90 minuti circa, in una soluzione di saccarosio 25% in PB 0,1M contenente 0,01% di NaN_3 (sodio azide) a 4°C. A questo punto si è proceduti con i tagli delle sezioni al criostato, facendo tagli perpendicolari alla superficie vitreale, per ottenere sezioni spesse 10 μm . Le sezioni ottenute sono state montate su vetrini gelatinati portaoggetti e conservati a -20°C; per ogni frammento sono stati montati 5-10 vetrini gelatinati con 5 sezioni ciascuno.

3.5. Colorazione con DAPI

Le sezioni retiniche sono state colorate con DAPI (4',6 diamidino-2-phenylindole; Sigma), per effettuare l'analisi morfologica. Il DAPI è una molecola organica fluorescente capace di entrare nei nuclei cellulari e legarsi al DNA, ciò permette la visualizzazione di nuclei cellulari. I vetrini sono stati montati con vetrini coprioggetto, utilizzando una miscela di glicerolo in PB 0,1M contenente 1 $\mu\text{g/ml}$ di DAPI.

3.6. Immunofluorescenza

Con l'immunofluorescenza sono state marcate specifiche popolazioni cellulari del tessuto coltivato in "ex-vivo". Sono stati usati anticorpi specifici per la proteina CD31, per le cellule endoteliali. Inoltre per valutare l'apoptosi cellulare è stato usato un anticorpo specifico per la caspasi-3-attiva. I vetrini contenenti le sezioni ottenute al criostato, come descritto nel paragrafo precedente, sono stati asciugati e lavati in PB 0,1M; successivamente sono stati aggiunti ai vetrini gli anticorpi primari diluiti in una soluzione di Triton X-100 0,1% in PB 0,1M e incubati per tutta la notte a 4°C. L'anticorpo anti-CD31 è stato diluito 1:50; l'anticorpo anti-GFAP 1:200. La mattina seguente i vetrini sono stati asciugati e lavati in PB 0,1M e sono stati addizionati dell'anticorpo secondario

coniugato con Alexa Fluor 488 o con Alexa Fluor 546, diluito 1:200 in una soluzione di Triton X-100 0,1% in PB 0,1M; incubati per 2 ore a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione i vetrini sono stati lavati in PB 0,1M e montati con un vetrino coprioggetto usando una soluzione di PB 0,1M e glicerolo. Per quanto riguarda le doppie marcature, i vetrini sono stati addizionati dei due anticorpi primari (CD31 e caspasi-3-attiva) e incubati per tutta la notte a 4°C; successivamente alla notte d'incubazione i vetrini sono stati lavati in PB 0,1M e incubati per 2 ore a temperatura ambiente con i rispettivi anticorpi secondari, coniugati con Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 546.

3.7. Analisi d'immagine

I preparati di immunoistochimica o più precisamente di immunofluorescenza sono stati osservati al microscopio a fluorescenza, acquisendo le immagini all'ingrandimento 4× o 20×. Per analizzare le immagini acquisite, queste sono state convertite in scala di grigi e normalizzate al background. Grazie allo strumento "analisi" del software Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA), è stata misurata la densità di marcatura, in funzione del livello medio di grigio.

3.8. Real-Time RT-PCR

L'analisi dell'espressione di caspasi-3-attiva e VEGF è stata effettuata misurando i livelli dell'mRNA rispettivi, mediante tecnica molecolare Real-Time RT-PCR. I frammenti retinici, destinati a tale indagine molecolare, al termine della coltura organotipica sono stati immediatamente congelati a -80°C. Successivamente è stato estratto l'mRNA totale dai campioni, usando il protocollo d'estrazione con Triazol, è stato quindi purificato, risospeso in acqua sterile e quantificato mediante lettura spettrofometrica. Da 1µg dell'mRNA totale è stato sintetizzato il cDNA. I primer per la caspasi-3-attiva e per VEGF (Eurofins) sono stati disegnati per ibridare con le regioni corrispondenti nel topo. Primer per la caspasi-3 :

"forward" - GCACTGGAATGTCATCTCGCTCTG

"reverse" - GCCCATGAATGTCTCTCTGAGGTTG

Primer per il VEGF:

“forward” - GCACATAGGAGAGATGAGCTTCC

“reverse” - CTGCGCTCTGAACAAGGCT

Il controllo interno è stato l'mRNA del gene Rpl13a che è espresso costitutivamente dalla retina. Anche i primer per Rpl13a sono stati disegnati per ibridare con le sequenze geniche nel topo. La reazione di amplificazione è stata eseguita in un termocicizzatore (MJ-MiniTM, Bio Rad) per 40 cicli. Ogni ciclo è costituito da 10'' di denaturazione a 95°C e 20'' di annealing ed estensione dei filamenti a 58°C. Quando la reazione di amplificazione è terminata sono state analizzate le curve di melting, mediante aumento della temperatura da 65,0°C a 95,0°C, con incrementi di 0,5°C ogni secondo.

3.9. Western blot

Al termine della coltura organotipica, i campioni destinati all'analisi Western Blot sono stati distribuiti in vials, 4 frammenti su ciascun vials. Vi sono stati aggiunti 100µl di buffer di lisi, contenente: 20mM HEPES pH 7,4, 150mM NaCl, 5mMEDTA , 3mM EGTA, 4mg/ml n-dodecil-β-maltoside, 1% TRITON-X-100, 0,1% SDS, un cocktail di inibitori di proteasi e fosfatasi, a questo punto sono stati sonicati al freddo, ottenendo degli omogenati. Quest'ultimi sono stati centrifugati a 14.000 rpm per 15 minuti a 4°C; sui surnatanti ottenuti è stato fatto il dosaggio proteico mediante metodo Bradford. Da ciascun campione è stata prelevata un'aliquota, tale da contenere 30µg di proteine; le aliquote prelevate sono state sottoposte a corsa elettroforetica SDS-PAGE. In seguito alla separazione elettroforetica delle proteine, è stato effettuato il trasferimento proteico dal gel di corsa elettroforetica a membrana di polivinildenfluoruro (PVDF), mediante trasferimento manuale o Transblot (Trans-Blot TurboTM, Biorad). La membrana è stata poi sottoposta a blocking mediante incubazione con latte 3% per 1h su basculatore. A seguito del blocking la membrana è stata lavata con TTBS (tween transfer buffer solution) e addizionata del Mab1 murino diretto contro il citocromo c, nella diluizione 1:500. La membrana è stata così incubata per tutta la notte a 4°C. La mattina seguente, sono stati ripetuti i lavaggi in TTBS ed è stato aggiunto l'anticorpo secondario anti-mouse coniugato con perossidasi di rafano (IgG HRP) con la diluizione 1:12500.

Come controllo di caricamento è stata ricercata la β -actina, quindi alla membrana è stato aggiunto anche un MAbI murino contro la β -actina nella diluizione 1:2500. Grazie a una reazione di chemoluminescenza, utilizzando il reattivo Luminolo, le bande sono state rese luminiscenti e acquisite allo strumento Chemidoc XRS+ (Bio-Rad). Mediante il software Image Lab 3.0 è stata fatta la misura della densità ottica (OD) delle bande per fare l'analisi comparativa dei livelli di citocromo C; i dati sono stati normalizzati per i livelli di OD della banda corrispondente alla β -actina. I dati sono stati espressi come media \pm SEM e sono stati originati da tre campioni, ciascuno contenente 4 frammenti retinici, cioè una retina intera, per ogni condizione sperimentale.

3.10. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Con il kit commerciale ELISA sono stati misurati i livelli di VEGF rilasciati dal tessuto nel terreno d'incubazione, al termine delle colture ex-vivo, o presenti negli omogenati degli espianti retinici. La misurazione è stata condotta con lettura allo spettrofotometro (Microplate-Reader 680 XR, Bio Rad). Ogni esperimento è stato eseguito in duplicato e i dati sono stati espressi come media \pm SEM.

3.11. Statistica

Per ogni risultato elaborato dalle precedenti tecniche descritte, è stata fatta l'analisi statistica, applicando il test ANOVA e il post test Newman Keuls usando il software Graph Pad Prism (Graph Software, San Diego, CA, USA). Il $p < 0,05$ è stato considerato significativo; ogni risultato è stato espresso come media \pm SEM.

3.1.1. Preparazione delle figure

Le immagini di immunofluorescenza e con colorazione DAPI sono state acquisite con un microscopio a fluorescenza NIKON Eclipse E800, provvisto di telecamera Digital-Sight DS-U3, usando il software DS-filc camera (Nikon Europe). Le immagini digitali sono state ottimizzate per luminosità e contrasto mediante l'utilizzo del software Adobe Photoshop (Adobe System, Mountain View, CA, USA).

4. Risultati

4.1. Caratterizzazione del modello sperimentale: apoptosi ed espressione/rilascio di VEGF

Gli espianti sono stati coltivati su supporti Millicell-CM con terreno di coltura descritto nei paragrafi precedenti; Le condizioni su cui è stata fatta l'analisi sono tre : HG, OS e presenza di AGEs.

4.1.1. Modello HG

4.1.1.1. Indagine di immunoistochimica per l'analisi dei livelli di espressione della caspasi-3-attiva

È stata analizzata la variazione dell'espressione della caspasi-3-attiva su sezioni retiniche immunomarcate, mediante la diversa intensità dell'immunomarcatura per questo marker apoptotico, in funzione alle concentrazioni di glucosio nel terreno (controllo 6mM; HG: 45mM o 75mM) e in funzione alla durata dell'incubazione (3,7 o 10gg)(Fig.17).

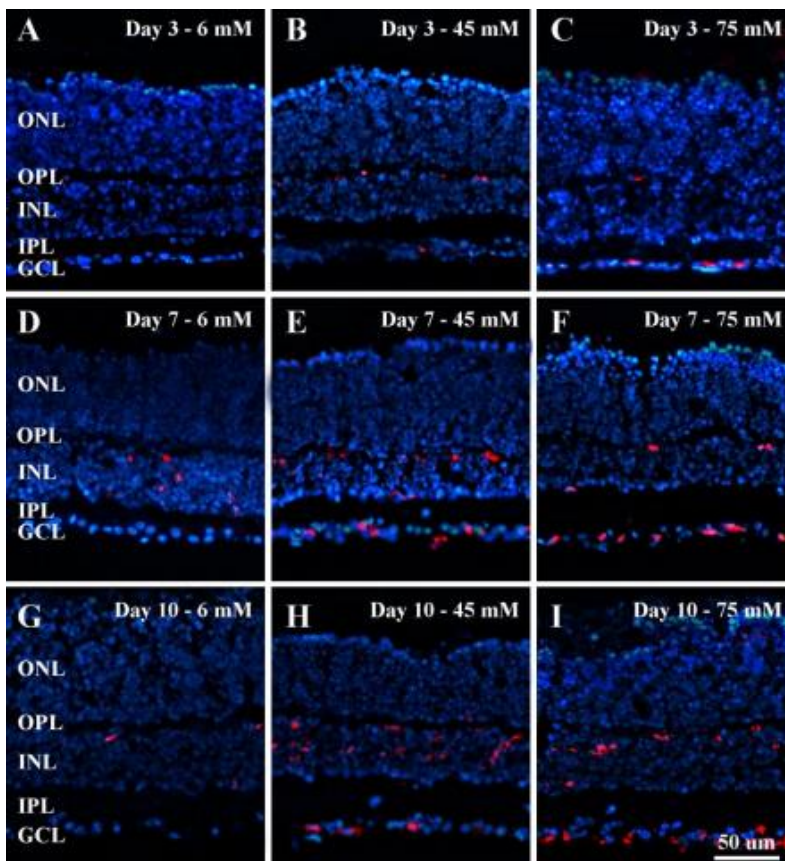


Figura 10 Espianti retinici coltivati per 3,7 e 10gg, immunomarcati per la caspasi-3-attiva in condizioni di controllo (A,D e G) o in condizioni di HG: 45mM (B,E ed H) e 75mM (C,F e I). Nell'HG si osserva un incremento dell'espressione del marker apoptotico che dopo 10gg è maggiormente evidenziabile.

Barra di calibrazione 50μm.

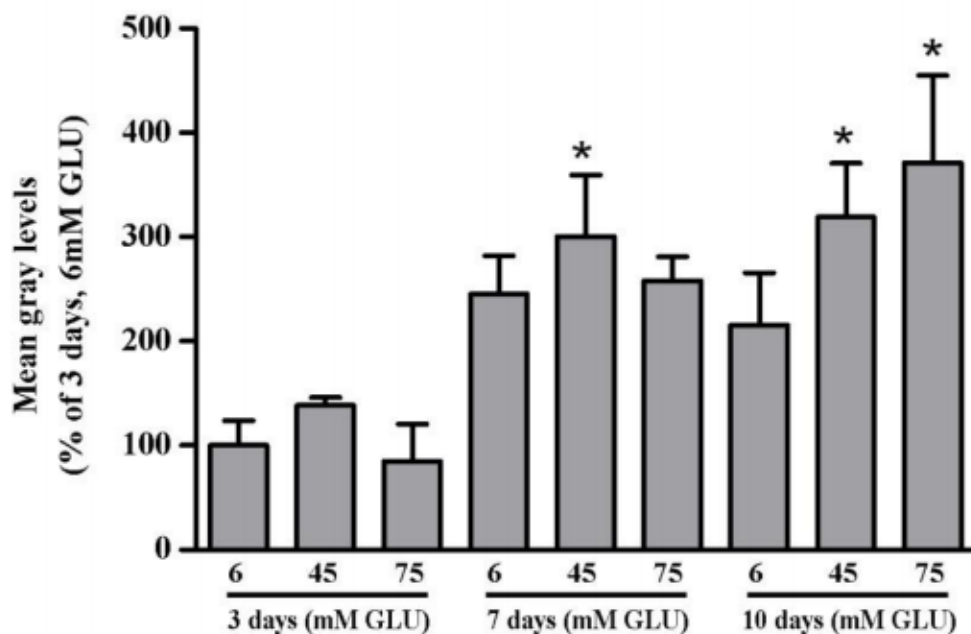


Figura 11 Quantificazione dei livelli medi di grigi su immagini di sezioni retiniche immunomarcate per la caspasi-3-attiva. Gli espianti sono stati incubati in condizioni di controllo (6mM) e di HG (45mM e 75mM) per 3, 7 e 10gg. * $p < 0,05$ (ANOVA) rispetto al controllo. Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM; $n=3$.

L'analisi dei livelli medi di grigio nelle immagini di sezioni di immunoistochimica per il marker apoptotico caspasi-3-attiva ha confermato quanto riportato in figura 17. Si può evidenziare che l'immunomarcatura per caspasi-3-attiva è assente dopo 3gg di coltura, per la condizione di controllo (6mM), ed è scarsamente osservabile dopo 7 e 10gg di coltura. Nella condizione di HG l'immunomarcatura è già ben evidenziabile dopo 7gg di coltura; si osserva infatti, una significatività nell'incremento delle cellule marcate alla concentrazione 45mM di glucosio a 7 e 10gg d'incubazione, avendo l'effetto massimo a 10gg d'incubazione, dove si osserva un aumento progressivo, correlato con l'aumento della concentrazione di glucosio (Fig.18).

4.1.1.2. Livelli di apoptosi e rilascio di VEGF

Mediante tecnica Western Blot, è stata analizzata la variazione dei livelli di citocromo c, in espianti di retina incubati per 10gg in condizioni di controllo (6mM GLU) e di HG (45mM o 75mM GLU). È emerso che si ha un comportamento dose-risposta per i livelli di citocromo c, aumentando progressivamente con l'aumento delle concentrazioni di glucosio; l'incremento, rispetto al

controllo, dei livelli di citocromo c nella condizione di incubazione degli espianti retinici di 45mM, non risulta statisticamente significativa. Inoltre la differenza dei valori tra la condizione 75mM, 45mM e controllo è statisticamente significativa (Fig.19 A).

C'è correlazione tra i livelli di citocromo c e il rilascio di VEGF da parte degli espianti retinici. Mediante tecnica ELISA è stato quantificato il VEGF rilasciato dagli espianti nei terreni di coltura d'incubazione 2,6 o 10gg in presenza di glucosio 6mM (per il controllo), 45mM o 75mM (gli ultimi due per la condizione di HG). È stato osservato l'incremento dei livelli di VEGF rilasciato nel terreno da parte degli espianti retinici, correlato positivamente con l'aumento delle concentrazioni di glucosio. Si ha aumento significativo del rilascio di VEGF rispetto alla condizione di controllo, nella condizione di HG 45mM per 6 e 10gg. Con il trattamento HG 75mM si osserva un aumento significativo del rilascio di VEGF, rispetto al controllo (6mM) e alla condizione 45mM (HG), già dopo 2gg di coltura con un effetto notevolmente maggiore; la differenza del comportamento degli espianti 75mM con quello degli espianti di controllo e della condizione HG 45mM è notevole anche nelle colture con una durata di 6 e 10gg(Fig.19B).

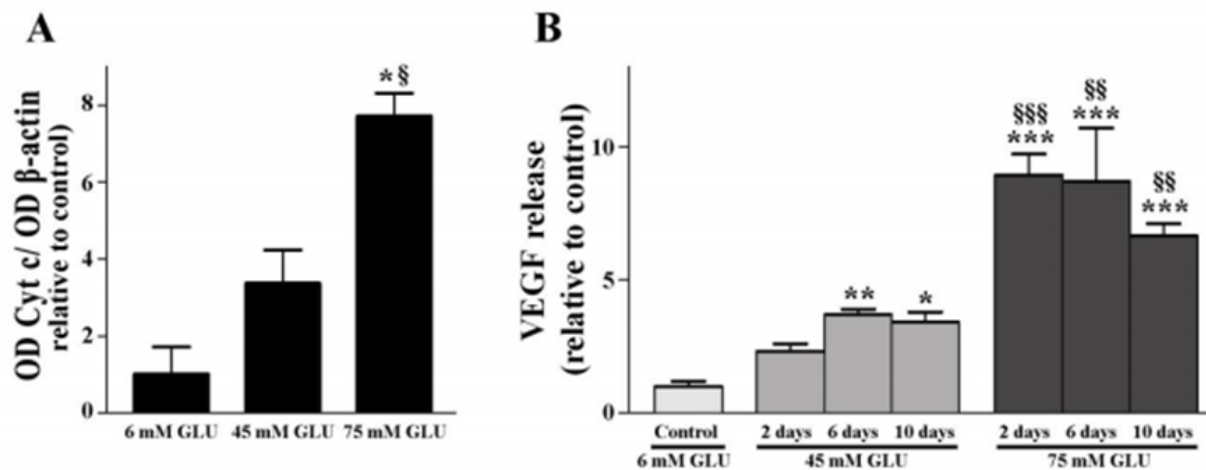


Figura 12 A) Quantificazione dei livelli di citocromo c da espianti retinici coltivati per 10gg in condizioni di controllo(6mM) o di HG(75mM), applicando la tecnica Western Blot. B) Misura dei livelli di VEGF rilasciato nel terreno da espianti retinici, coltivati in condizioni 6mM(controllo), 45mM e 75mM (HG) per 2,6 e10gg, mediante tecnica ELISA. Sia nella figura A e sia nella figura B i valori sono espressi come percentuali dei valori di controllo (6Mm GLU).*p<0,05,**p<0,01, ***p<0,001 rispetto al controllo(6mM GLU).§p<0,05, §§p<0,01, §§§p<0,001 rispetto al relativo 45mM GLU. Gli istogrammi esprimono i valori come media \pm SEM. n=3.

4.1.2. Modello OS

4.1.2.1. Analisi dei livelli di caspasi-3-attiva su espianti retinici immunomarcanti

I livelli di espressione della caspasi-3-attiva, su sezioni retiniche immunomarcate per tale marker apoptotico, risultano aumentati per i campioni coltivati con H_2O_2 per 1, 3 o 5 gg rispetto alla condizione di controllo (priva di H_2O_2) (Fig.20). L'incremento è funzione sia della concentrazione di H_2O_2 e sia del tempo di incubazione degli espianti retinici con l'agente ossidante.

L'analisi dei livelli medi di grigio delle immagini acquisite al microscopio a fluorescenza, ha confermato quanto riportato in figura 20. (Fig.21) E' stato riscontrato che per gli espianti coltivati con $1\mu M$ di H_2O_2 dopo 1gg di coltura, la caspasi-3-attiva era assente, ma era presente per le sezioni immunomarcate di espianti retinici coltivati con $10\mu M$ e $100\mu M$ di H_2O_2 .

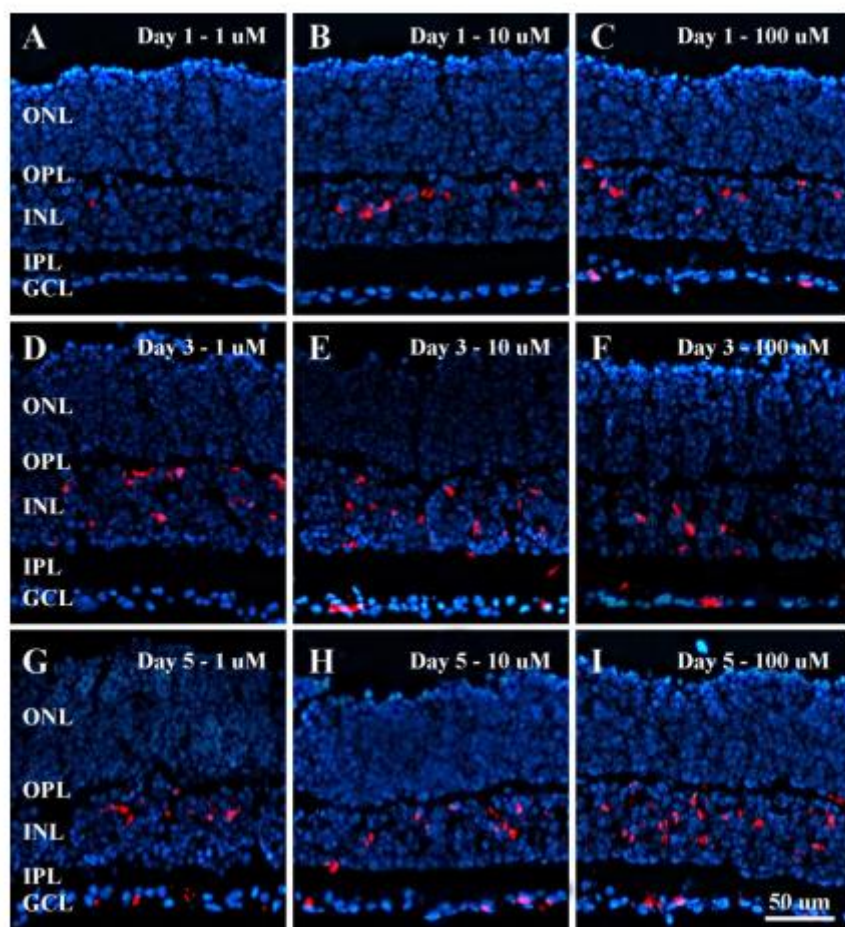


Figura 13. Sezioni di espianti retinici, immunomarcate per la caspasi-3-attiva, coltivate in terreno contenente H_2O_2 per 1, 3, o 5gg. A,D,G) H_2O_2 $1\mu M$; B,E,H) H_2O_2 $10\mu M$; C,F,I) $100\mu M$. Barra di calibrazione: $50\mu m$.

Nelle sezioni immunomarcate di espianti retinici coltivati per 3gg, è stato rilevato incremento della caspasi-3-attiva rispetto a 1gg di coltura, solo nel trattamento che prevedeva 1 μ M di H₂O₂, mentre per i campioni provenienti dalla coltura 10 μ M e 100 μ M non c'è stato un incremento maggiore rispetto alle colture di H₂O₂ 1 μ M. E' stato rilevato invece un incremento maggiore per tutte e tre le varie concentrazioni di H₂O₂ dopo 5gg di coltura degli espianti di retina.

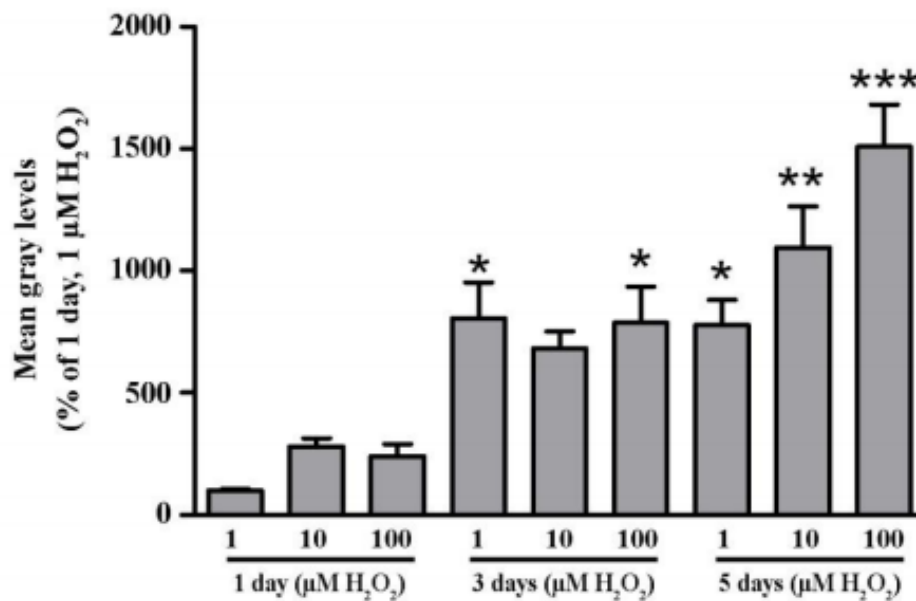


Figura 14 Analisi quantitativa dei livelli medi di grigio di sezioni retiniche immunomarcate, provenienti da colture organotipiche della durata di 1, 3 o 5gg, in condizioni con 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M di H₂O₂. È stato usato il test statistico ANOVA. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0.001 rispetto a 1gg 1 μ M H₂O₂. Gli istogrammi esprimono i valori come la media \pm SEM; n=3.

4.1.2.2. Apoptosi nei vasi retinici: doppia marcatura caspasi 3 attiva-CD31

Grazie alla doppia immunomarcatura di sezioni di espianti retinici, è stato valutato che l'apoptosi nei capillari retinici aumenta progressivamente con il tempo di coltura degli espianti con 100 μ M di H₂O₂ nel terreno d'incubazione. La doppia immunomarcatura era rivolta alla proteina CD31 delle membrane endoteliali dei capillari retinici e alla caspasi-3-attiva (Fig.22).

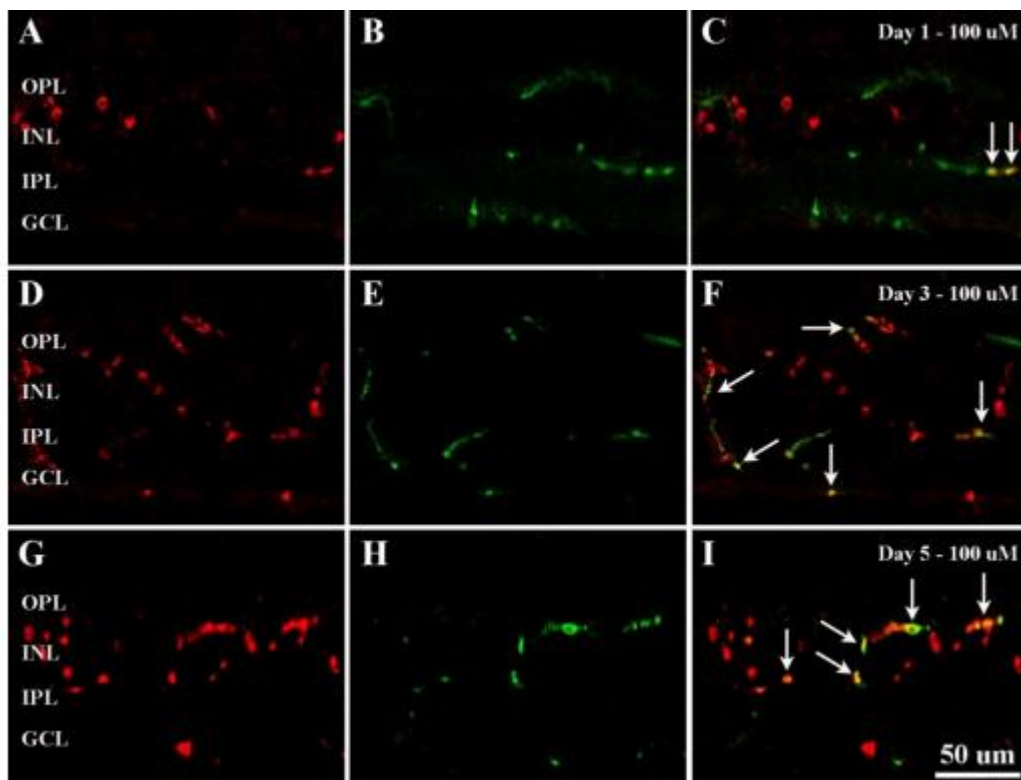


Figura 15 Doppia immunomarcatura per CD31 e caspasi-3-attiva su sezioni di espianti retinici coltivati per 1, 3 o 5gg con 100µM H₂O₂. A, D, G) marcati per caspasi-3-attiva; B, E, H) marcati per CD31. C, F, I) sovrapposizioni delle immagini delle due diverse marcature. Le frecce indicano i punti di sovrapposizione della marcatura per caspasi-3-attiva con la marcatura per CD31. Barra di calibrazione: 50µm.

In particolare è stato riscontrato che dopo 1gg di coltura nella condizione 100µM H₂O₂, la marcatura per la caspasi-3-attiva era presente in alcune cellule della retina, con poca percentuale di cellule endoteliali, ovvero erano poche le cellule con la doppia marcatura. Nelle sezioni di espianti di retina coltivati per 3gg nella condizione 100µM H₂O₂, è stato riscontrato un aumento generale delle cellule marcate per la caspasi-3-attiva e in particolare un aumento notevole della frazione di cellule retiniche marcate da entrambi per i due marker usati nella tecnica di immunoistochimica. Uno stesso comportamento, ma più dominante, è stato rilevato per gli espianti retinici coltivati con la stessa condizione per 5gg; in questo caso la percentuale delle cellule doppiamente marcate era notevole.

4.1.2.3. Quantificazione dei livelli di citocromo c relativi e confronto con i livelli di mRNA del VEGF

Mediante tecnica del Western Blot è emerso che la quantità di citocromo c, di espianti retinici coltivati per 5gg nella condizione di controllo (6mM GLU senza H₂O₂) o 10μM, 100μM H₂O₂, aumenta progressivamente con l'aumento delle concentrazioni di H₂O₂ nel terreno di coltura degli espianti (Fig.23A). Dagli istogrammi si evince che per la condizione 10μM H₂O₂, l'espressione del citocromo c aumenta del 50%, con una differenza statisticamente significativa. Nella condizione con la massima concentrazione di H₂O₂ (100μM), si osserva un incremento tre volte superiore rispetto al controllo.

Dagli stessi campioni sono stati misurati i livelli di mRNA del VEGF, questi correlano positivamente con l'andamento dell'espressione del citocromo c, nonostante qualche variazione (Fig.23b). Nei campioni coltivati per 5gg con la condizione 10μM H₂O₂ non è emersa alcuna differenza dei livelli di mRNA del VEGF, i quali sono apparsi identici ai livelli riscontrati nel controllo. Si è assistiti, invece, a un aumento pari a 2 volte i livelli presenti nel controllo, per quanto riguarda l'mRNA di espianti coltivati per 5gg con 100μM H₂O₂ nel terreno d'incubazione; differenza, questa, statisticamente significativa.

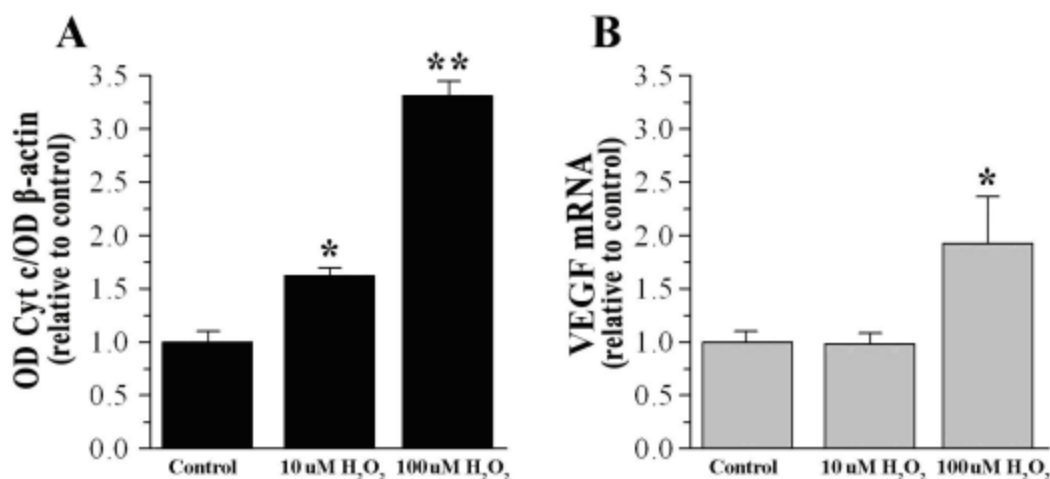


Figura 16 A) Quantificazione dei livelli di citocromo c, mediante tecnica Western Blot, su espianti retinici coltivati per 5gg in condizioni di controllo o 10μM o 100μM H₂O₂. B) Misura con tecnica RT-PCR dei livelli di mRNA del VEGF, sugli stessi campioni. I valori sono espressi come percentuali dei controlli. *p<0,05, **p<0,01 rispetto al controllo. Gli istogrammi rappresentano la media ± SEM; n=3.

4.1.2.4. Rilascio del VEGF

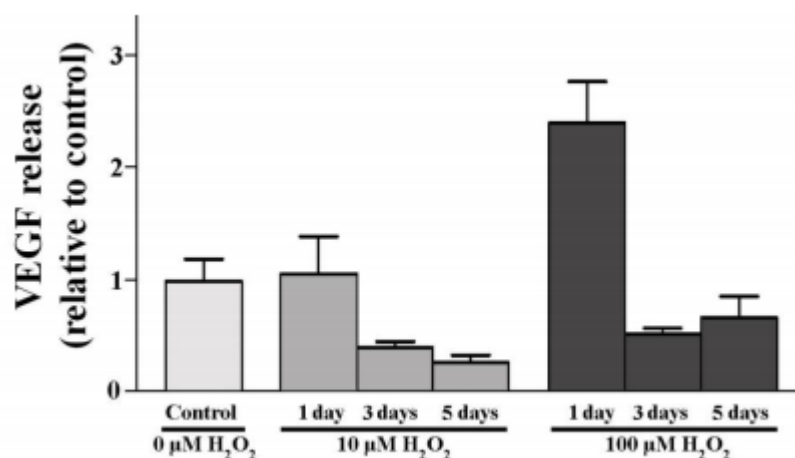


Figura 17 Misura dei livelli di VEGF rilasciato nel terreno, mediante tecnica ELISA. Differenze non statisticamente significative, causa probabilmente del piccolo numero di campioni per ciascuna prova. Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM; n=3.

I livelli di VEGF rilasciati dagli espianti di retina, coltivati per 1, 3 o 5gg in condizioni di controllo o 10μM o 100μM H₂O₂, sono stati misurati attraverso tecnica ELISA (Fig.24). Per i campioni coltivati per 1gg in condizioni con 10μM H₂O₂, non sono state rilevate variazioni dei livelli di VEGF rilasciati nel terreno di coltura rispetto al controllo; mentre sono aumentati negli espianti con condizione 100μM H₂O₂, anche se in modo non significativo. Con l'aumento del tempo di coltura non è stato rilevato questo comportamento. Negli espianti delle colture di 3 e 5 gg con condizione di 10μM H₂O₂ e 100μM H₂O₂, i livelli di VEGF presenti nel terreno erano minori rispetto al controllo. Sia per la coltura di 3gg e sia per quella di 5gg è stato osservato un leggero aumento del rilascio di VEGF nel terreno nella condizione con 100μM H₂O₂ rispetto alla condizione con 10μM H₂O₂, ma non significativo.

4.1.3. Modello AGE

4.1.3.1. Analisi dei livelli di caspasi-3-attiva su sezioni retiniche immunomarcate

Nelle indagini di immunoistochimica, effettuate su sezioni retiniche di espianti coltivati per 2, 7 o 10gg in terreni contenenti 100μg/ml di AGEs, è emerso che l'espressione della caspasi-3-attiva aumenta in funzione del tempo di esposizione dei frammenti retinici agli AGEs (Fig.25)

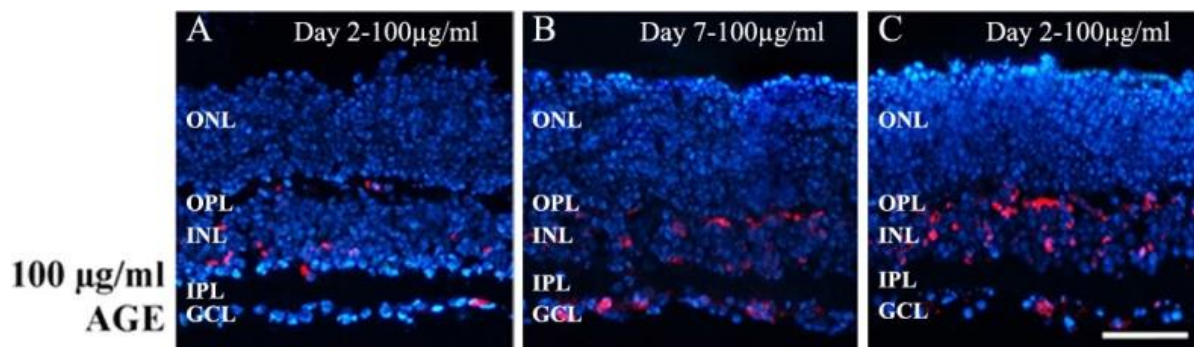


Figura 18 Analisi dell'espressione della caspasi-3-attiva su sezioni immunomarcate, per tale marker apoptotico, di espianti coltivati per 2, 7 o 10gg con 100µg/ml di AGEs nel terreno di coltura. Barra di calibrazione 50µm.

L'analisi dei livelli medi di grigio, eseguita su immagini acquisite al microscopio a fluorescenza di sezioni retiniche coltivate per 2, 7 o 10gg ha confermato quanto esplicitato nella figura 25. È stato, infatti riscontrato che dopo 2gg di coltura dei frammenti retinici con 100µg/ml di AGEs nel terreno, erano poche le cellule marcate per la caspasi-3-attiva, mentre dopo 7gg e ancor di più dopo 10gg di coltura in queste condizioni, le cellule che esprimevano la caspasi-3-attiva erano significativamente maggiori (Fig.26).

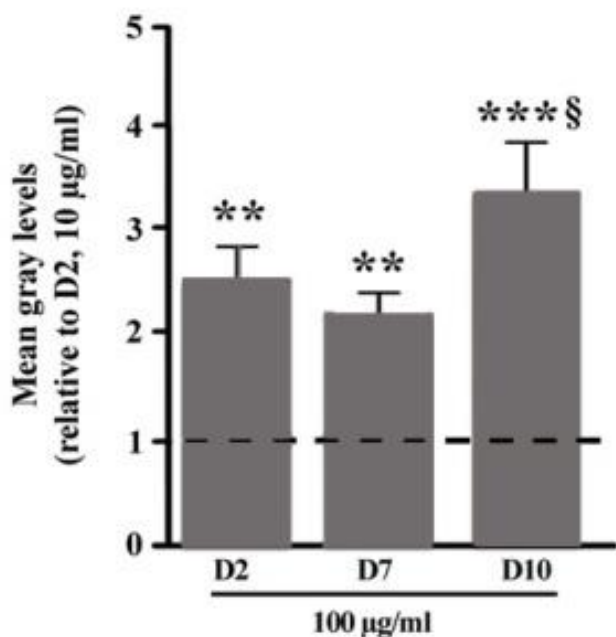


Figura 19. Analisi dei livelli medi di grigi delle immagini acquisite di sezioni immunomarcate per la caspasi-3-attiva. Le sezioni retiniche derivano da espianti coltivati per 2, 7 o 10gg in condizioni di 100µg/ml di AGEs- **p<0,01, ***p<0,001 rispetto al controllo; §p<0,05 rispetto al trattato D7. Gli istogrammi rappresentano la media ±SEM.

4.1.3.2. Quantificazione apoptotica

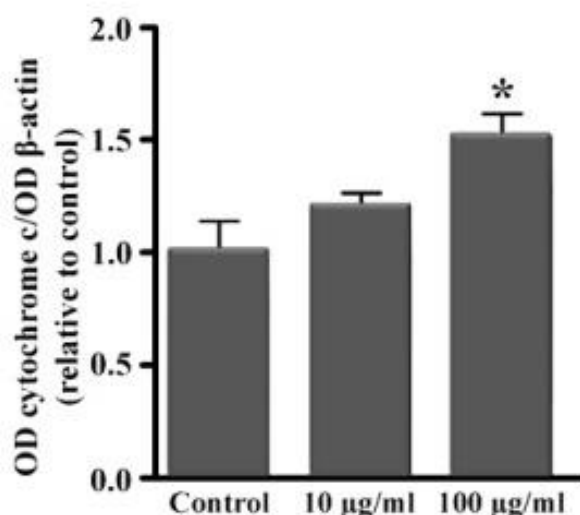


Figura 20. Morte cellulare dose-risposta in espianti retinici incubati per 7gg in condizioni di controllo (6mM senza AGEs), in presenza di AGEs nel mezzo (10 μ g/ml o 100 μ g/ml). * $p < 0,05$ rispetto al controllo. Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM; $n=3$.

Mediante tecnica Western Blot, è stata analizzata la variazione dei livelli di citocromo c, in espianti di retina incubati per 7gg in condizioni di controllo (6mM GLU, senza AGE) e di presenza di AGE (10 μ g/ml o 100 μ g/ml)(Fig.27). È emerso che si ha un comportamento dose-risposta per i livelli di citocromo c, aumentando progressivamente con l'aumento delle concentrazioni di AGE; l'incremento dei livelli di citocromo c risulta statisticamente significativa, rispetto al controllo solo nella condizione di incubazione degli espianti retinici con 100 μ g/ml di AGEs; non risulta significativa la differenza tra le due condizioni stressanti.

4.1.3.3. Rilascio di VEGF nel mezzo di coltura

Nella caratterizzazione del modello "AGE" sono stati misurati sia i livelli di VEGF rilasciati nel mezzo di coltura e sia i livelli rilasciati all'interno del tessuto stesso con tecnica ELISA. Le condizioni di coltura erano: controllo (6mM GLU senza AGEs) e 10 μ g/ml AGE o 100 μ g/ml AGE sia per 2gg e sia per 7gg di coltura (Fig.28).

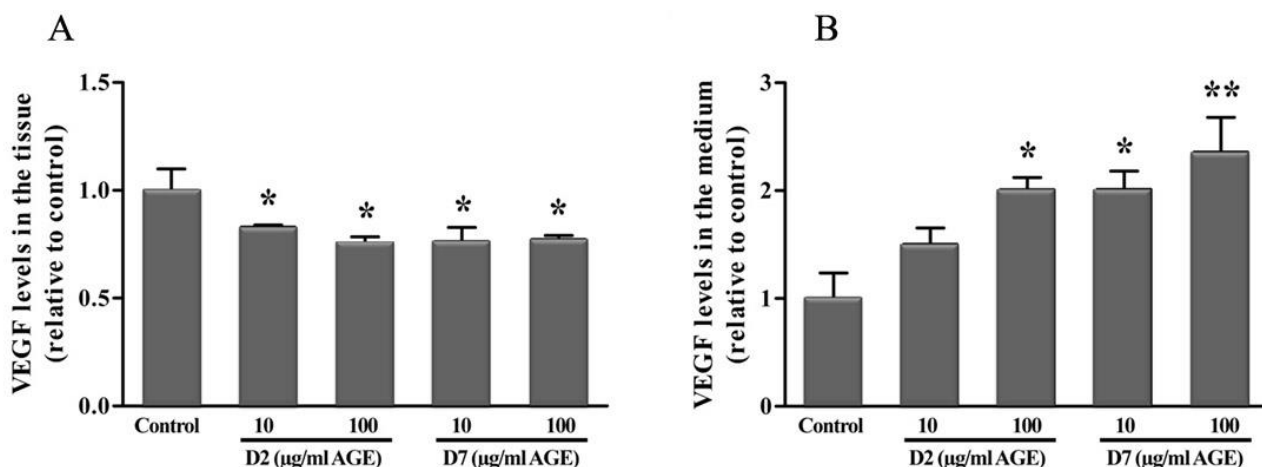


Figura 21. A) Misura del VEGF nel tessuto; B) Rilascio di VEGF nel mezzo di coltura. Condizioni di incubazione: controllo (6mMGLU senza AGE), 10µg/ml AGE o 100µg/ml AGE; 2gg e 7gg di coltura. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ rispetto al controllo. Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM; $n=3$.

Nella figura 28A si osserva un leggero decremento dei livelli di VEGF nel tessuto di espianti trattati per 2gg con 10µg/ml AGE rispetto al controllo; mentre per le altre condizioni di coltura i livelli di VEGF presenti nel tessuto subiscono un lieve decremento restando costanti. I livelli di VEGF rilasciati nel mezzo di incubazione (Fig. 28B) dagli espianti retinici coltivati per 2gg o 7gg in condizioni di controllo e 10µg/ml AGE o 100µg/ml AGE subiscono un incremento significativo rispetto al controllo; solo l'incremento del VEGF rilasciato, del trattamento di 2gg con 10µg/ml AGE, non è risultato statisticamente significativo.

Inoltre sono stati valutati i rapporti dei livelli di VEGF presenti nel tessuto e rilasciati nel mezzo; è stata valutata anche la somma dei livelli di VEGF all'interno del tessuto e rilasciati nel mezzo di coltura (Fig. 29). È stato osservato un decremento rispetto al controllo (6mM GLU senza AGE) del rapporto all'aumentare delle concentrazioni di AGE, somministrate nel terreno. La quantità di VEGF totale, invece, tende ad aumentare progressivamente con l'incremento della concentrazione di AGEs somministrata nel terreno di coltura.

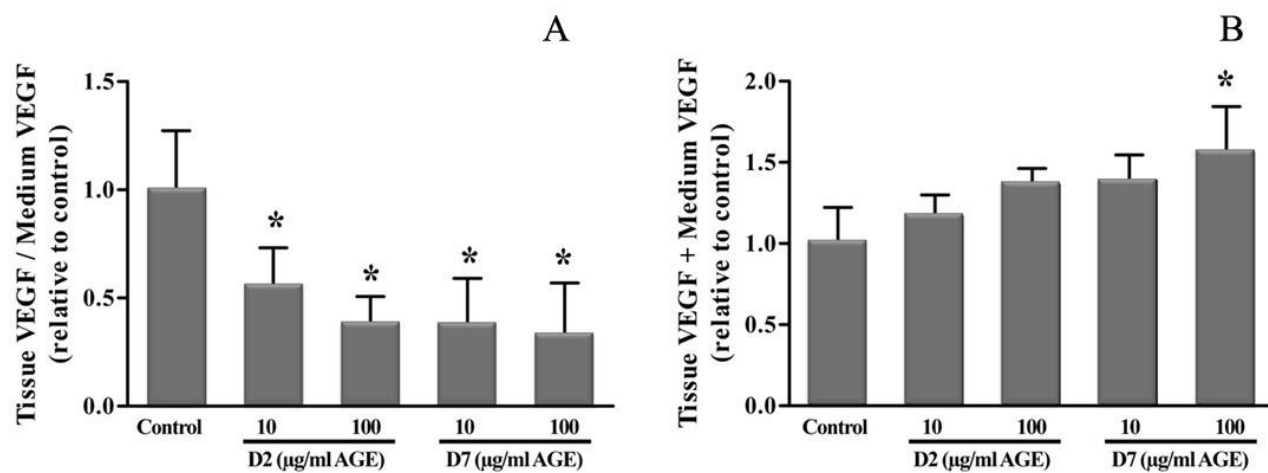


Figura 22.A) Rapporto dei livelli di VEGF all'interno del tessuto e dei livelli rilasciati nel mezzo di incubazione.

B) VEGF totale. Espianti retinici incubati in condizioni di controllo (6mM GLU senza AGE), 10µg/ml AGE o

100µg/ml AGE. * $p < 0,05$ rispetto al controllo. Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM;

4.2. Strategia neuroprotettiva

4.2.1. Modello “HG”

4.2.1.1. Analisi dei livelli di mRNA della caspasi-3-attiva e di VEGF in espianti retinici trattati con OCT e PACAP

Per valutare gli effetti neuroprotettivi di OCT e PACAP, sono stati misurati i livelli di mRNA di caspasi-3-attiva e di VEGF, in espianti di retina coltivati in condizioni di controllo o in presenza di HG (75mM) e trattati con OCT e PACAP (Fig.30).

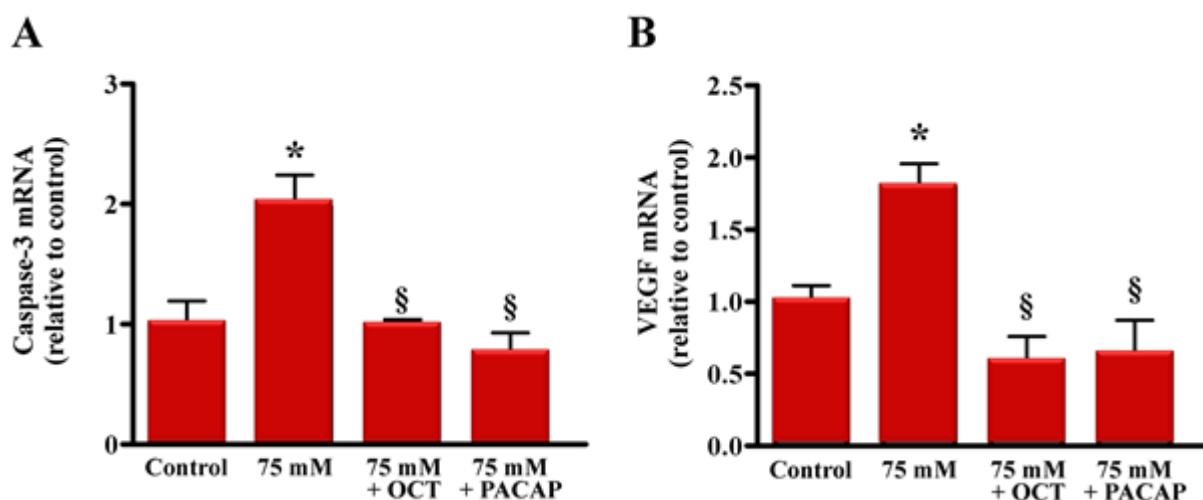


Figura 30. A) Livelli di mRNA della caspasi-3-attiva di espianti retinici coltivati in condizioni di controllo, di HG (75mM) e con trattamento 1 μ M OCT o 0,1 μ M PACAP. B) Livelli di mRNA di VEGF dello stesso tipo di campioni. Si osserva effetto neuroprotettivo. * $p < 0,05$ rispetto al controllo (6mM), § $p < 0,05$ rispetto al relativo 75mM. Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM; $n=3$.

L'aumento dei livelli di mRNA di caspasi-3-attiva (marker apoptotico) e di VEGF, degli espianti retinici incubati in condizioni di HG (75mM) per 10gg, è stata inibita dalla somministrazione nel terreno di 1 μ M di OCT e di 0,1 μ M di PACAP.

4.2.1.2. Rilascio di VEGF nel mezzo di coltura

Attraverso l'ausilio di un kit commerciale ELISA sono stati misurati i livelli di VEGF rilasciati nel mezzo di coltura da espianti coltivati per 2gg in condizioni di controllo (6mM GLU) o HG (75mM) e

con trattamenti farmacologici, 1 μ M OCT e 0,1 μ M PACAP. I livelli di VEGF rilasciati nel terreno di coltura erano massivamente aumentati nella condizione HG (75mM) rispetto al controllo, ma sono risultati significativamente ridotti in entrambi i trattamenti farmacologici (*Fig.31*).

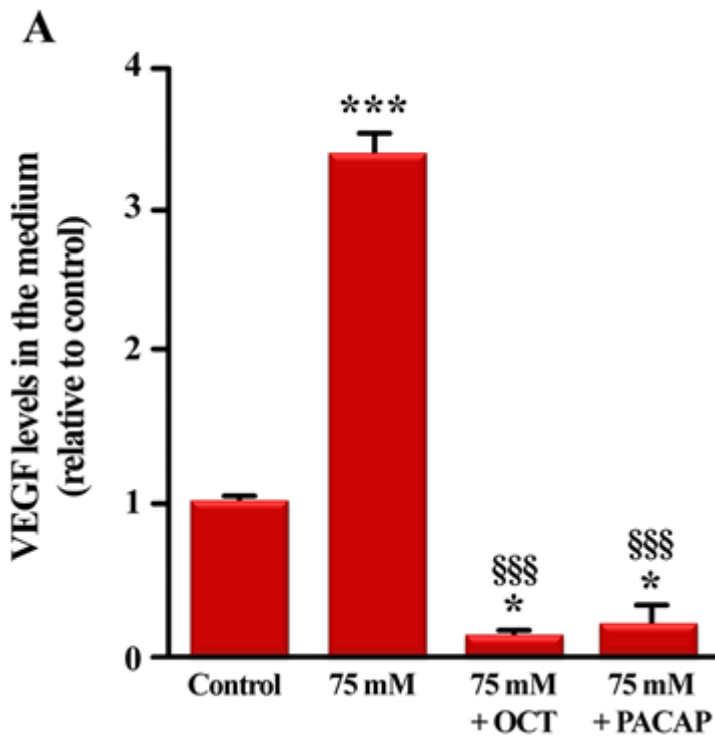


Figura 31. Rilascio di VEGF nel mezzo di coltura, da espianti retinici coltivati in condizioni di controllo (6mM), alto glucosio (75mM), 1 μ M OCT e 0,1 μ M PACAP. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ rispetto al controllo. §§§ $p < 0,001$ rispetto alla condizione alto glucosio. Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM. $n=3$.

4.2.1.3. Quantificazione dei livelli di mRNA di caspasi-3-attiva in presenza di VEGF-trap

L'analisi RT-PCR ha permesso di analizzare la variazione dell'espressione di mRNA di caspasi (marker di apoptosi) di espianti incubati in condizioni di controllo (6mM GLU), in condizioni di HG (45mM) e con VEGF-trap nel terreno (*Fig.32*). Si assiste ad aumento dei livelli di mRNA del marker apoptotico nella condizione di HG (45mM) rispetto al controllo (6mM). L'aumento dei livelli di mRNA della caspasi-3-attiva è ancor più maggiore e statisticamente significativo nei campioni trattati con VEGF-trap.

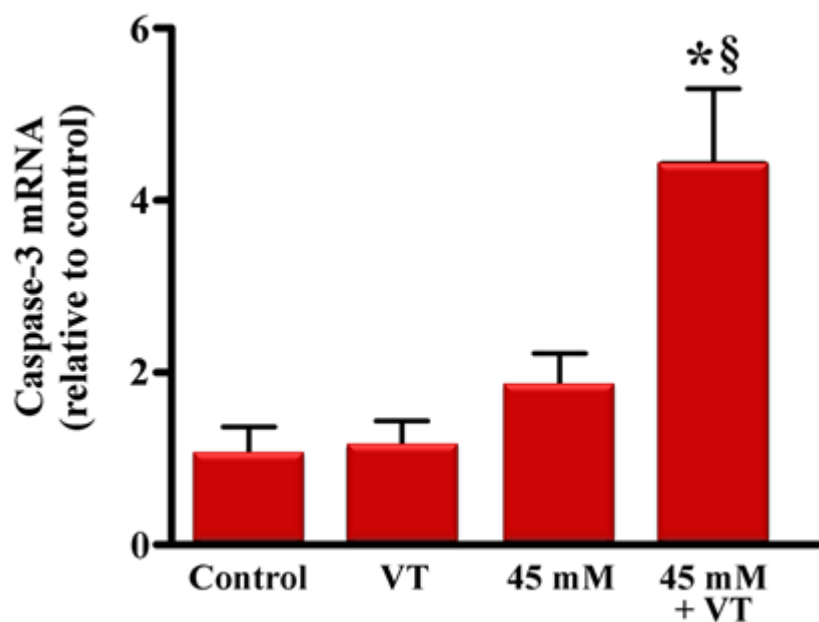


Figura32. Analisi dei livelli di mRNA della caspasi, da espianti trattati con 6mM (controllo), 45mM (HG) e VEGF-trap.*p<0.05 rispetto al controllo; §p<0,05 rispetto alla condizione HG. Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM; n=3.

4.2.2. Modello OS

4.2.2.1. Analisi dei livelli di mRNA della caspasi-3-attiva e del VEGF in espianti retinici trattati con OCT e PACAP

Mediante tecnica RT-PCR sono stati misurati i livelli di mRNA di caspasi-3-attiva e di VEGF di espianti coltivati in condizioni di controllo (6mM GLU, senza H₂O₂), in condizioni di OS (100μM H₂O₂) e con due trattamenti farmacologici: 1μM OCT e 0,1μM PACAP. Come si può notare dalla figura 33, i livelli di mRNA sia del marker apoptotico e sia del VEGF aumentano nella condizione di OS e subiscono un decremento, statisticamente significativo, con i trattamenti somministrati al terreno, ovvero 1μM OCT e 0,1μM PACAP. Il decremento risulta più forte per i livelli di mRNA del VEGF.

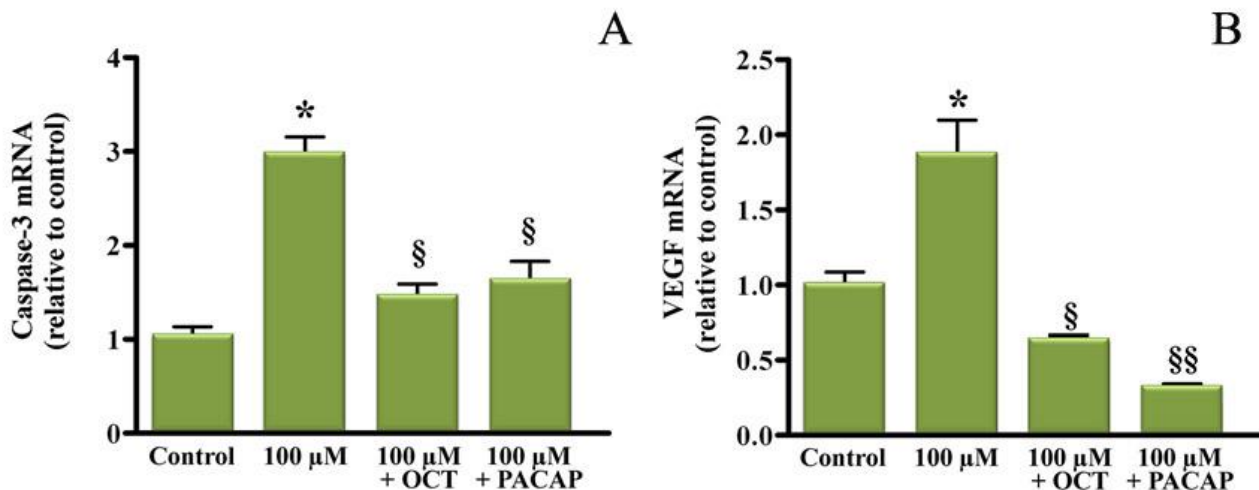


Figura 33. Livelli di mRNA di A)caspasi-3-attiva e B)VEGF di espianti retinici coltivati per 5gg in condizioni di controllo(6mM GLU senza H₂O₂), OS (100μM H₂O₂) e trattati con 1μM OCT e 0,1μM PACAP.*p<0,05 rispetto al controllo;§p<0,05, §§p<0.01 rispetto alla condizione stress ossidativo. Gli istogrammi rappresentano la media ±SEM.

4.2.2.2. Rilascio di VEGF nel mezzo di coltura

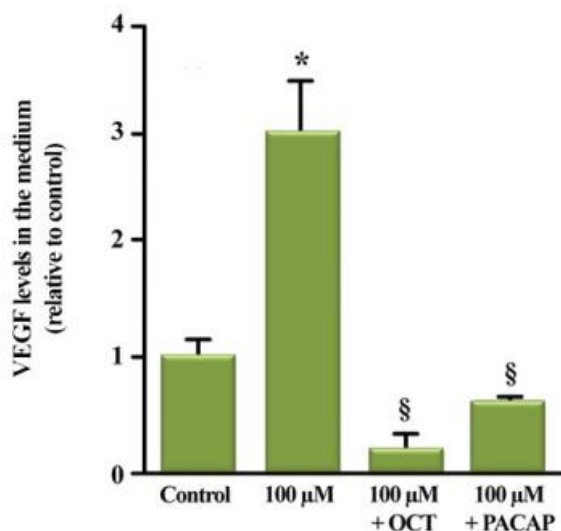


Figura 34. Rilascio di VEGF nel mezzo di coltura da espianti coltivati in condizioni di controllo, di OS e con trattamenti farmacologici (1μM di OCT e 0,1μM di PACAP). *p<0,05 rispetto al controllo;§p<0,05 rispetto a 100μM H₂O₂. Gli istogrammi rappresentano la media ±SEM.

Con tecnica ELISA sono stati misurati i livelli di VEGF rilasciato nel terreno di coltura dagli espianti di retina. Questi sono stati coltivati per 1gg nella condizione di controllo (6mM GLU, senza H_2O_2), di OS (100 μ M H_2O_2) e con trattamenti somministrati nel terreno, 1 μ M OCT e 0,1 μ M PACAP. Si evince dalla figura 34 (Fig.34) che i livelli di VEGF rilasciati dai campioni trattati con la condizione di OS, sono due volte maggiori rispetto alla condizione di controllo; mentre, quando gli espianti sono trattati con 1 μ M di OCT e 0,1 μ M di PACAP il rilascio di VEGF è significativamente inibito.

4.2.2.3. Misura dei livelli di citocromo c in presenza di VEGF-trap

Espianti di retina coltivati per 5gg nella condizione di controllo (6mM GLU senza H_2O_2), con 10 μ M di H_2O_2 e in presenza di VEGF-trap, sono stati usati per l'analisi, mediante Western Blot, dell'andamento dei livelli di citocromo c. Il risultato riscontrato consiste in un innalzamento dei livelli di citocromo c nei campioni trattati con 10 μ M di H_2O_2 rispetto al controllo, che continua a verificarsi anche nella condizione che prevede il trattamento VEGF-trap. Le variazioni dei livelli ottenuti non hanno raggiunto la significatività statistica, ma appare esplicito il comportamento (Fig.35).

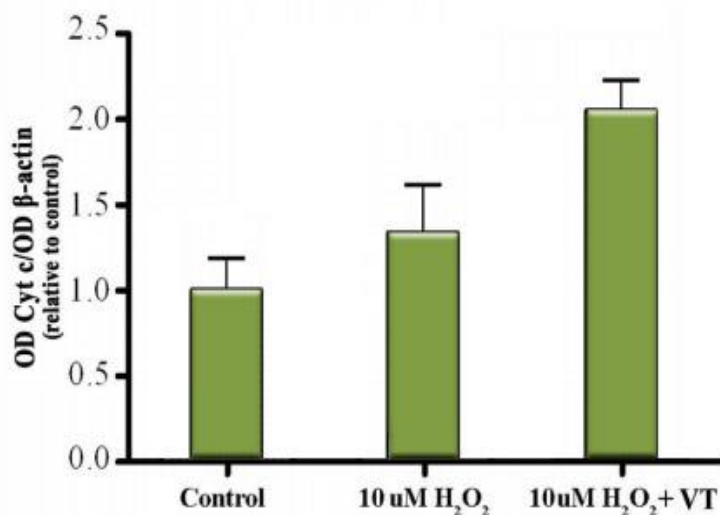


Figura35. Variazione dei livelli di citocromo c in espianti retinici incubati per 5gg nella condizione di controllo (6mM GLU senza H_2O_2), con 10 μ M di H_2O_2 e in presenza di VEGF-trap. Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM; n=3.

4.2.3. Modello AGE

4.2.3.1. Analisi dei livelli di mRNA della caspasi-3-attiva e del VEGF di espianti trattati con OCT e PACAP

Anche nel modello di DR coltivato per 2gg nella condizione con AGEs, presenti nel terreno d'incubazione, mediante RT-PCR sono stati analizzati i livelli di mRNA della caspasi-3-attiva e del VEGF da espianti retinici incubati in condizioni di controllo (6mM, senza AGEs), con trattamento AGEs 100µg/ml e con trattamento 1µM OCT e 0,1µM PACAP. È risultato che l'espressione dell'mRNA di caspasi-3-attiva e di VEGF aumenta più del 50%, nel trattamento con AGEs, rispetto al controllo e si osserva inibizione statisticamente significativa nei trattamenti neuroprotettivi fatti con 1µM OCT o 0,1µM PACAP, sia dei livelli di mRNA della caspasi-3-attiva e sia di mRNA del VEGF (Fig.36).

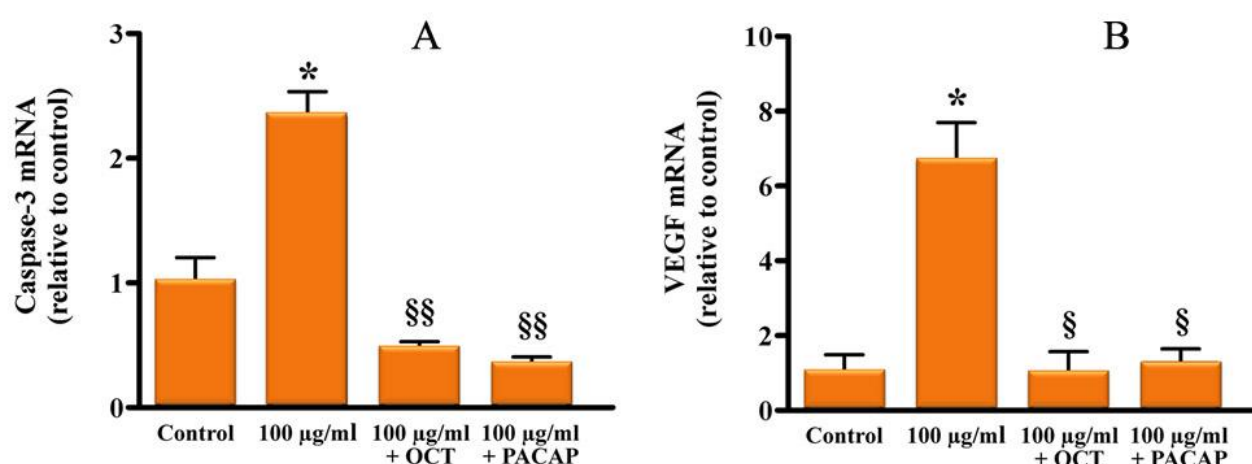


Figura 36. A) Livelli di mRNA della caspasi-3-attiva e B) del VEGF di espianti coltivati per 2gg in condizioni di controllo (6mM GLU, senza AGEs), con 100µg/ml AGEs e trattamenti neuroprotettivi (1µM OCT o 0,1µM PACAP). *p<0,05 rispetto al controllo; §p<0,05, §§p<0,01 rispetto al trattamento 100µg/ml AGE. Gli istogrammi rappresentano la media ±SEM; n=3.

4.2.3.2. Rilascio di VEGF nel mezzo di coltura

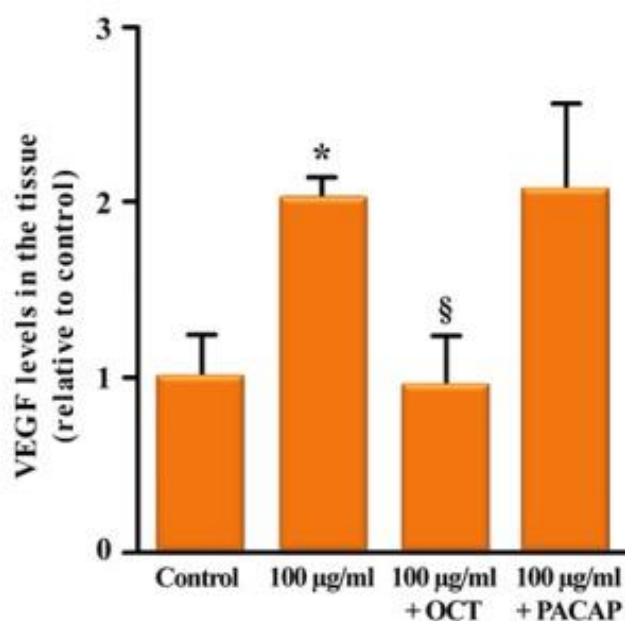


Figura 37. Analisi ELISA per la valutazione del rilascio di VEGF nel mezzo di coltura da espianti incubati per 2gg, in condizioni di controllo (6mM senza GLU), 100µg/ml AGEs e con trattamenti neuroprotettivi 1µM OCT o 0,1µM PACAP. * $p < 0,05$ rispetto al controllo; §§ $p < 0,05$ rispetto al trattamento AGE. Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM. n=3.

Mediante tecnica ELISA sono stati misurati i livelli di VEGF rilasciati nel mezzo di coltura dagli espianti coltivati per 2gg in condizioni di controllo (6mM GLU senza AGE), con 100µg/ml AGEs e con trattamenti neuroprotettivi, 1µM OCT o 0,1µM PACAP. Dalla figura 37 (Fig.37) emerge che il VEGF rilasciato dai campioni, nel mezzo di incubazione, trattati con 100µg/ml AGEs, aumenta del 50% rispetto al controllo. Si osserva, invece inibizione statisticamente significativa, rispetto al trattamento 100µg/ml AGEs, del rilascio del fattore trofico, nella condizione di incubazione che prevedeva trattamento con 1µM OCT; mentre non è stato riscontrato decremento del rilascio di VEGF dagli espianti retinici trattati con 0,1µM PACAP. Inoltre quest'ultima "non variazione" dei livelli di VEGF rilasciati, non presenta significatività statistica, probabilmente per il numero esiguo di campioni impiegati.

5. Discussione

In questo lavoro di tesi sperimentale è stata definita e validata una terza condizione sperimentale per riprodurre la situazione patologica della DR in un modello ex-vivo di retina di topo, precedentemente sperimentato con esiti positivi. Il modello, che prevedeva già due condizioni caratteristiche della DR come alto glucosio (HG) e stress ossidativo (OS), è stato ridefinito con la terza condizione stressante, che è l'esposizione della retina in coltura ad AGEs. Tale modello riproduce così i tre elementi patologici più imponenti che guidano il meccanismo patogenetico della DR. La scomposizione nel modello ex-vivo dei fenomeni patogenetici della malattia permette sia la miglior comprensione del comportamento tissutale in condizioni iperglicemiche, ma soprattutto dà la possibilità di selezionare target terapeutici mirati ed efficaci. Proprio sulla base del comportamento tissutale osservato, infatti, sono stati saggiati neuropeptidi con azione neuroprotettiva, ottenendo risultati promettenti per l'attuazione di eventuali terapie preventive per la DR.

5.1. Caratterizzazione del modello sperimentale: apoptosi ed espressione/rilascio di VEGF

Il presente lavoro di tesi si inserisce in una finestra sperimentale dove è stato validato un modello ex-vivo per lo studio della DR. La retina di topo espantata e incubata su membrane microporose (Insert Millicell) in condizioni di controllo (6mM GLU), di alto glucosio (45mM o 75mM GLU) e di stress ossidativo (10µg/ml o 100µg/ml H₂O₂) mantiene la propria struttura e non subisce grossi danni dovuti all'espanto e alla coltura fuori dall'organismo, fino a 10gg di incubazione. Inoltre i vantaggi di una coltura organotipica (o ex-vivo), ovvero la capacità di questo approccio sperimentale di superare i limiti dati da uno studio in vitro e da uno studio in vivo, hanno spinto l'interesse nel proseguire uno studio delle fasi iniziali di DR, usando questo modello sperimentale. In particolare in questo lavoro, per rendere il più fedele possibile la riproduzione del quadro patofisiologico, con quello che si presenta nei pazienti diabetici, è stata sperimentata una terza condizione stressante, caratteristica della DR, l'esposizione ad AGEs. Anche con quest'ultima condizione perturbante è stato possibile indagare le risposte tissutali all'insulto iperglicemico. Lo

studio è stato focalizzato sull'analisi di morte cellulare e produzione o rilascio di VEGF nelle tre condizioni e sulla comprensione della relazione tra apoptosi e produzione o rilascio di VEGF, al fine di sostenere l'ipotesi neurodegenerativa. Secondo tale ipotesi lo sviluppo delle complicazioni vascolari della DR si realizzerebbero a seguito di un danno dei neuroni retinici, che a causa dell'intima interazione con la componente vascolare, si ripercuote anche in un danno vascolare dal quale si ottengono le manifestazioni cliniche.

5.1.1. Apoptosi

5.1.1.1. Modello HG

Nel modello HG la condizione stressante è appunto l'alto glucosio (45mM o 75mM) con il rispettivo controllo (6mM). L'analisi di morte cellulare per apoptosi è stata eseguita in vari modi, sia con tecniche molecolari e sia con immunofluorescenza, permettendo così la localizzazione delle cellule apoptotiche nel tessuto. L'analisi molecolare dei livelli di citocromo c presenti nel citoplasma, che è un marker apoptotico in quanto nel processo di apoptosi si libera nel citoplasma cellulare a causa della rottura delle membrane mitocondriali, dove tale peptide risiede, ha mostrato che l'apoptosi aumenta notevolmente all'aumentare delle concentrazioni di glucosio con cui la retina in coltura è incubata. Ciò suggerisce che l'iperglicemia causa danno cellulare inducendo apoptosi. Sono molte infatti, le informazioni presenti in letteratura sul danno cellulare indotto dall'iperglicemia, che come abbiamo precedentemente visto causa alterazioni di svariate vie biochimiche andando verso la morte delle cellule, soprattutto dei neuroni retinici che risultano le più vulnerabili alle alterazioni metaboliche (Kern T. S., 2008.; Jindal, 2015; Alistair J. Barber T. W., 2011,). Le cellule apoptotiche sono state visualizzate per la localizzazione con tecniche di immunofluorescenza, eseguita su sezioni di retina incubate nelle medesime condizioni di coltura descritte in questo paragrafo. L'immunolocalizzazione, realizzata con l'ausilio di anticorpi anti-caspasi-3-attiva ha dato riscontri paragonabili con le indagini molecolari, ovvero il numero di cellule apoptotiche aumenta progressivamente con l'aumento delle concentrazioni di glucosio ed è nettamente maggiore quando la coltura è protratta fino a 10gg. Ciò conferma che l'iperglicemia causa morte cellulare per apoptosi dei neuroni retinici, con un'entità correlata positivamente all'incremento delle concentrazioni di glucosio e soprattutto evidenzia il fatto che la persistenza nel tempo delle condizioni iperglicemiche sono responsabili massivamente del danno retinico, infatti i pazienti diabetici sviluppano la retinopatia e altre disfunzioni, come nefropatia e

cardiopatie, dopo molti anni di iperglicemia ematica. Ancor di più, questo dato trova riscontro nel fatto che è il 75% dei pazienti con diabete mellito di tipo 1 contro il 50% di diabetici con diabete mellito di tipo 2 a sviluppare la DR (Krisztina Szabadfi E. P., 2014; Gábel, 2013).

5.1.1.2. Modello OS

Lo stress ossidativo è un elemento della DR che si sviluppa molto precocemente per una serie di ragioni viste nell'introduzione, ed è considerato un elemento unificante tutte le alterazioni biochimiche (Brownlee, JUNE 2005), quindi riprodurre la condizione dello stress ossidativo è di grande aiuto nello studio della malattia. Più precisamente si cerca di riprodurre la condizione OS con l'incubazione degli espianti in presenza di H_2O_2 (perossido di idrogeno) , perché è stato dimostrato che nella retina diabetica aumentano i livelli di questa molecola ossidante (Cotter, 2011; Asma Kassab, 2012) e perché come visto, la maggior parte del O^{2-} si converte in H_2O_2 . Inoltre è stato validato l'uso di tale molecola per la riproduzione di condizioni di stress ossidativo nella retina (Xing Zhou, 2014; Ying-Jen Chen, 2015;). L'apoptosi, indagata con l'analisi dei livelli di citocromo c e con la visualizzazione delle cellule esprimenti la caspasi-3-attiva, ha mostrato che lo stress ossidativo induce sofferenza cellulare con morte per apoptosi. In particolare grazie alla doppia immunomarcatura è stato possibile sostenere la teoria neurodegenerativa; la visualizzazione delle cellule esprimenti CD31 e caspasi-3-attiva, di sezioni di retina espiantata, immunomarcate per tali markers apoptotici, ha evidenziato che le prime cellule ad andare in apoptosi sono i neuroni e l'evento diventa sempre più grande all'aumentare del tempo di trattamento con OS. All'aumentare del tempo di trattamento stressante, anche le cellule endoteliali, esprimenti CD31 che è un marker endoteliale, muoiono per apoptosi con una percentuale inferiore rispetto ai neuroni. Considerato che la percentuale di neuroni nella retina è del 95%, diventa logico il fatto che l'entità dei fenomeni apoptotici che interessano i neuroni è di dimensioni superiori rispetto al coinvolgimento della componente vascolare, ma i neuroni sono anche i primi a degenerare e ciò supporta la teoria neurodegenerativa. Studi della funzionalità retinica, eseguiti in vivo, infatti mostrano alterazioni dei potenziali d'azione , misurati con tecnica ERG, molto tempo prima della comparsa di lesioni vascolari e ciò concorda con la precoce degenerazione della neuroretina (Alistair J. Barber T. W., 2011,).

5.1.1.3. Modello AGE

Come descritto nei precedenti paragrafi introduttivi, tra le vie biochimiche alterate dall'iperglicemia c'è la via dei polioli-fosfato che a causa dell'aumento di fruttosio, porta all'aumento di AGEs (prodotti finali di glicazione non enzimatica), ovvero si ha un'accelerazione delle reazioni di formazione di questi prodotti che tendono ad accumularsi nella retina. Gli AGEs sono molecole tossiche responsabili di alterazioni proteiche, attivazione microgliale e danni strutturali al DNA, essi sono una presenza caratteristica di molte malattie neurodegenerative, come l'Alzheimer, per cui l'accumulo nella retina può essere un segnale che sostiene la teoria neurodegenerativa (Joanna M. Tarr, 2013; Stitt, 2001). Riprodurre l'accumulo nella retina di queste molecole migliora sicuramente la comprensione dei meccanismi patogenetici. In letteratura è riportato l'uso di AGE-BSA (albumina di siero bovino glicata) per riprodurre l'accumulo di AGE in colture organotipiche sia di retina e sia sezioni di cervello (A Lecleire-Collet, 2005;; MASAYOSHITAKEUCHI, 2000), in cui si dimostra che tale condizione determina morte di cellule neuronali. Nel lavoro presente la condizione AGE ha determinato aumento dell'apoptosi, valutata con l'analisi del citocromo c mediante Western Blot, in relazione all'aumento della concentrazione di AGE-BSA usata. In particolar modo con l'immunolocalizzazione delle cellule esprimenti la caspasi-3-attiva è emerso che la morte ha luogo primariamente nel GCL e aumenta estendendosi anche nell'INL con l'aumento del tempo di esposizione ad AGEs. Ciò supporta l'idea che gli AGEs che si accumulano nella retina di pazienti diabetici, inducono sofferenza della neuroretina, oltre che sofferenza dei vasi sanguigni e soprattutto sono una caratteristica comune delle malattie neurodegenerative, quindi aiutano a dedurre che la DR è una malattia neurodegenerativa.

Concludendo si può affermare che l'iperglicemia e le altre due componenti indagate, causano danni cellulari primariamente alla neuroretina e si conferma il fatto che ciò che è responsabile per lo più dei danni retinici è la persistenza dell'insulto iperglicemico, insieme al conseguente stress ossidativo e accumulo di AGEs, a sostenere e sviluppare la DR nei pazienti diabetici. Seppure con le tecniche usate nel lavoro sperimentale illustrato non è possibile definire con esattezza le specifiche cellule neuronali danneggiate, è possibile evidenziare un comportamento tipico della sofferenza neuronale, ovvero l'aumento dell'espressione di GFAP da parte delle cellule di Muller. Questo fenomeno, come accennato nei paragrafi precedenti è sinonimo di attivazione gliale e sofferenza tissutale e in letteratura è ampiamente descritto che l'iperglicemia induce anche

questo fenomeno (J. Middeldorp, 2011; Wiedemann, 2012;). Prove eseguite su sezioni di retina, espantata e incubata con le condizioni sopra descritte, e immunomarcate per GFAP non hanno mostrato aumento del marker di attivazione gliale. Il risultato negativo è evidentemente causa del fatto che questo tipo di alterazione si sviluppa in tempi più lunghi di trattamento in condizioni stressanti, rispetto ai tempi indagati in questo tipo di lavoro. In letteratura, infatti emerge che l'aumento della produzione di GFAP si ha 3 settimane dopo l'induzione del diabete, in modelli in vivo, e che l'apoptosi neuronale precede l'up-regolazione della GFAP (Krisztina Szabadfi E. P., 2014,).

5.1.2. Alterazione del metabolismo del VEGF

L'altro aspetto analizzato è stato il rilascio di VEGF nel mezzo di coltura con tecnica ELISA; il ruolo del VEGF nella DR sembra essere abbastanza chiaro, esso infatti ha azione pro-angiogenica e sostiene così la proliferazione vascolare. I suoi livelli aumentano notevolmente nelle condizioni di iperglicemia, si ritrovano elevati livelli di VEGF nel liquido vitreale di pazienti diabetici (Gardner, 2014 April ;); sulla base dell'importanza del VEGF nello sviluppo della DR, sono stati analizzati i livelli del suo rilascio dalla retina. I dati ottenuti confermano che all'aumentare, sia della concentrazione e sia del tempo di esposizione ad alto glucosio, a H_2O_2 e ad AGEs, non solo aumenta la morte cellulare, ma aumenta anche la produzione e il rilascio del VEGF nel mezzo di coltura. Analizzando i livelli di VEGF presenti nel tessuto e rilasciati nel mezzo, con tecnica ELISA, è emerso che il rapporto tra i livelli di VEGF presenti nel tessuto e rilasciati nel mezzo, tende a diminuire; mentre la quantità di VEGF totale tende ad aumentare con l'incremento delle concentrazioni di AGEs, ciò suggerisce che non solo si ha un aumento nel rilascio ma anche nella sintesi di VEGF e sembrerebbe che la maggior parte del VEGF prodotto dal tessuto viene immediatamente rilasciato nel mezzo di coltura. L'ipotesi più ragionevole è che l'aumento del rilascio del VEGF deriva dalla volontà dei neuroni di stimolare la formazione di nuovi vasi sanguigni per compensare la situazione ischemica a cui l'iperglicemia conduce (Neville N. Osborne*, 2004).

5.1.3. Correlazione tra apoptosi e produzione/rilascio di VEGF

I risultati ottenuti rivelano che l'apoptosi e l'espressione o rilascio di VEGF sono eventi precoci nella DR e hanno una correlazione positiva, ovvero nelle tre condizioni sperimentali di incubazione degli espianti retinici, si assiste ad incremento dell'apoptosi e dell'espressione e rilascio del VEGF all'aumento delle concentrazioni di glucosio, di H₂O₂ e di AGEs e all'aumento del tempo di incubazione. Questi dati suggeriscono che quando la retina è perturbata oltre ad avere cellule che vanno incontro ad apoptosi, si realizza una risposta che tenderebbe all'adattamento del tessuto nelle condizioni perturbanti, mediante l'aumento del VEGF, il quale potrebbe essere considerato un evento secondario al danno neuronale. Anche se non sono state fatte indagini specifiche per conoscere con esattezza quali tipi cellulari muoiono primariamente per apoptosi è emerso che si tratta sicuramente di neuroni e ciò concorda con quanto descritto in letteratura, dov'è noto che sono primariamente i neuroni ad andare in apoptosi e solo successivamente il danno si estende alle cellule vascolari (Kern T. S., 2008.; Alistair J. Barber T. W., 2011,). Inoltre ci sono evidenze che neuroni e cellule gliali rispondono agli insulti stimolando la produzione di VEGF (Davide Cervia E. C., 2012; D. Cervia* G. C., 2013,). L'aumento iniziale del VEGF sarebbe quindi un "aiuto", stimolato dai neuroni, per fronteggiare la situazione perturbante, ma l'azione del VEGF diviene fallimentare e così si stabilizza un quadro patofisiologico sempre più grave al crescere del tempo di predisposizione all'alto glucosio. Secondo tale ipotesi usare farmaci che neuro-proteggono la retina dovrebbe inibire o diminuire l'incremento di VEGF, anche se alcune evidenze mostrano che in realtà il VEGF ha anche azione neuroprotettiva.

5.2. Strategia neuroprotettiva

5.2.1. OCT e PACAP riducono apoptosi ed espressione/rilascio di VEGF

La strategia neuroprotettiva è stata valutata in questo lavoro di tesi come possibile prevenzione nello sviluppo della DR; in particolare sulla base delle ipotesi precedentemente discusse, è stata data attenzione alla possibilità di inibire la sofferenza neuronale, valutandone gli effetti sulle conseguenze. Esattamente sono stati valutati gli effetti, di due neuropeptidi, sull'apoptosi e il conseguente rilascio di VEGF. I neuropeptidi usati sono OCT, che è un analogo sintetico della somatostatina e PACAP, altro neuropeptide fisiologico. È emerso negli ultimi anni che tali molecole hanno azione neuroprotettiva. In molti lavori scientifici emerge che l'attivazione del recettore sst_2 protegga i neuroni retinici dalla morte neuronale, indotta da ischemia. L'attivazione del recettore si realizza con SST o con analoghi sintetici, come octreotide OCT (Davide Cervia G. C., 2008; D. Cervia* a. G., 2013,). Sia SST e sia OCT hanno avuto azioni preventive sulla neurodegenerazione, in un modello di ratto diabetico (Gerasimos E Krassas, 2007); sembra che questa neuroprotezione si realizzi attraverso l'inibizione del rilascio del glutammato, che come accennato nei capitoli precedenti, ha azione ecitotossica (G. Casini E. C., 2005; Davide Cervia G. C., 2008). La riduzione della sofferenza neuronale conduce anche alla riduzione della produzione/rilascio di VEGF da parte dei neuroni. Inoltre la riduzione dei livelli di SST associata a condizioni di neurodegenerazione, ha spinto l'interesse a saggiare SST o OCT come strategia terapeutica neuroprotettiva (Thermos, 2005; ESTHER CARRASCO, 2007).

L'altro neuropeptide saggiato, per cui vi sono evidenze neuroprotettive, è PACAP. Come descritto nei paragrafi introduttivi, PACAP protegge i neuroni retinici dalla degenerazione inibendo vie pro-apoptotiche e stimolando vie anti-apoptotiche; non solo agisce sull'apoptosi, ma previene anche la neovascolarizzazione (Krisztina Szabadfi E. P., 2014; Aliz Szabo, 2012; Gábel, 2013).

Nel lavoro presente sono stati aggiunti al terreno d'incubazione OCT o PACAP e sono stati valutati i livelli di apoptosi ed espressione/rilascio del VEGF, attraverso l'analisi dell'espressione dell'mRNA di caspasi-3-attiva e di VEGF e del VEGF rilasciato. Dalle prove effettuate sono stati ottenuti risultati in linea con ciò che è presente in letteratura, ovvero OCT e PACAP hanno mostrato azione neuroprotettiva, in quanto hanno determinato notevoli riduzione sia dell'apoptosi neuronale e sia dell'espressione e rilascio di VEGF in condizioni caratterizzanti la DR, come HG, OS e AGE. Da questi esperimenti non si hanno certezze sul fatto che sono i neuroni ad andare in apoptosi e che il

VEGF è solo una conseguenza della sofferenza neuronale, ma i dati ottenuti danno sostegno all'ipotesi secondo cui la neuroprotezione protegge i neuroni dall'apoptosi e inibisce così il conseguente rilascio di VEGF, che sembra essere un segnale di sopravvivenza rilasciato dai neuroni sofferenti.

5.2.2. Effetti del VEGF-trap

VEGF-trap è una proteina chimerica costituita da una porzione di legame specifica per i recettori VEGFR1/2 e da una porzione Fc specifica per il VEGF. Questa sua struttura la rende una proteina-trappola, ovvero capace di sequestrare il VEGF nel tessuto, competendo anche con il suo recettore. L'utilizzo di tale proteina ha messo in evidenza la possibile azione neuroprotettiva del VEGF, infatti negli espianti trattati con VEGF-trap i livelli di apoptosi erano maggiori rispetto al singolo trattamento stressante (HG e OS). Negli ultimi anni sta emergendo infatti, che il VEGF oltre ad essere un fattore pro-angiogenico e mitogeno è anche un fattore neurotrofico, con azione distribuita in tutto il SNC compresa la retina (Kun Lin Jin, 2000; Magali Saint-Geniez A. S., 2008). È stato mostrato che l'esposizione al VEGF determina una riduzione dose-dipendente dell'apoptosi di neuroni sia in vitro, indotta da ischemia o ecitotossicità del glutammato, sia in un modello di ischemia-riperfusion in vivo. L'azione è dovuta all'attivazione di una cascata di segnali, che si realizza con l'interazione del VEGF con VEGFR1/2, che porta all'attivazione di vie intracellulari di sopravvivenza con risposte cellulari anti-apoptotiche (Kun Lin Jin, 2000; Gomes E, 2007; Foxton RH, 2013;). Questa azione del VEGF potrebbe spiegare il perché i neuroni retinici e le cellule di Muller molto precocemente, nelle condizioni di stress iperglicemico, aumentano sia l'espressione e sia il rilascio del VEGF; avrebbe, quindi una tempestiva azione autocrina sugli stessi neuroni, inibendo le vie di segnalazione pro-apoptotica (Kern T. S., 2014;). Ecco che negli esperimenti eseguiti, il trattamento VEGF-trap determina aumento dell'apoptosi nelle condizioni di HG e OS, la proteina trappola infatti, elimina l'azione neuroprotettiva del VEGF.

L'applicazione del VEGF come neuroprotettore diventa così una possibilità, anche se il potenziale della molecola deve essere ancora ben analizzata e confermata, ma sicuramente pone anche maggiore attenzione sui vari trattamenti anti-VEGF attualmente in uso per la cura della DR.

6. Conclusioni

Il modello ex-vivo usato ha permesso di superare i limiti di un modello in vitro e la complessità di un modello in vivo, permettendo di riprodurre efficacemente la condizione fisiopatologica precoce della DR. Il lavoro sperimentale ha ottenuto risultati che supportano l'ipotesi neurodegenerativa, secondo cui il diabete induce sofferenza neuronale, che si esplica con apoptosi e aumento di VEGF da parte delle cellule di Muller; il VEGF avrebbe un'azione autocrina e paracrina. Nel primo caso ha azioni neurotrofiche e nel secondo caso stimola le cellule endoteliali alla neoangiogenesi; queste due azioni non riescono però a far adattare positivamente la retina all'insulto iperglicemico, in quanto l'azione trofica è insufficiente a proteggere i neuroni, e la neovascolarizzazione stimolata risulta fallimentare conducendo il tessuto a lesioni vascolari. Sulla base delle evidenze ottenute a supporto di questa ipotesi, il modello ex-vivo è stato usato anche per saggiare possibili molecole neuroprotettive, ottenendo riscontri promettenti. È così plausibile continuare a studiare la possibilità di trattamenti che precocemente prevengono l'induzione alla DR; in tal modo sarà possibile, neuroproteggendo, impedire lo sviluppo della malattia vascolare a carico della retina diabetica e scongiurare così le conseguenze drammatiche della DR, come la cecità. Sono ancora molti i punti da chiarire nel dettaglio, soprattutto riguardo alla consequenzialità degli eventi, ma le informazioni presenti in letteratura e ottenute da questo lavoro sperimentale sono promettenti sia per la miglior comprensione del meccanismo patogenetico della malattia e sia per l'applicazione di trattamenti preventivi della malattia.

7. Bibliografia

- A Lecleire-Collet, L. H. (2005;). Advanced glycation end products can induce glial reaction and neuronal degeneration in retinal explants. *Br J Ophthalmol*, 89:1631–1633.
- A.R. Caffé', P. A. (2001). Mouse retina explants after long-term culture in serum free medium. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 22: 263– 273.
- Alessandro Castorina, S. G. (2010). Effects of PACAP and VIP on hyperglycemia-induced proliferation in murine microvascular endothelial cells. *Peptides*, 31: 2276–2283.
- Alistair J. Barber, *. E. (1998). Neural Apoptosis in the Retina during Experimental and Human Diabetes. *J. Clin. Invest.*, Volume 102, Number 4, 783–791.
- Alistair J. Barber, E. L. (1998.). Neural Apoptosis in the Retina during Experimental and Human Diabetes. *J. Clin Invest.*, 102:783–791.
- Alistair J. Barber, T. W. (2011,). he Significance of Vascular and Neural Apoptosis to the Pathology of Diabetic Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, , 52: 1156:1163.
- Aliz Szabo, B. D. (2012). Effect of PACAP on MAP kinases, Akt and cytokine expressions in rat retinal hypoperfusion. *Neuroscience Letters*, 523: 93– 98.
- Angela M. Valverde, S. M.-R.-R. (2013). Proapoptotic and survival signaling in the neuroretina at early stages of diabetic retinopathy. *Molecular Vision*; , 19:47-53.
- Anne B. Fulton1, *. J. (2009). Retinal Degenerative and Hypoxic Ischemic Disease. 118(1): 55–61. doi:10.1007/s10633-008-9127-8.
- Asma Kassab, A. P. (2012). Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes. *Biochimie*, 94: 1837 e1848.
- Barber, J. A. ((2003)). A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 27: 283 – 290.
- Brownlee, M. (2004). The Pathobiology of Diabetic Complications. *Banting Lecture*, 54:1615-1625.
- Chad E.N. Reiter, X. W. (2006.). Diabetes Reduces Basal Retinal Insulin Receptor Signaling. *DIABETES*, 55: 1148-1156.
- Chan, K. a.-S. (2007). Oxidative Stress and Diabetic Retinopathy. *Experimental Diabetes Research*, Article ID 43603,12pages.
- Cheung N, M. P. (2010). Diabetic retinopathy. *Lancet*, 376:124-136.
- Cotter, D. G. (2011). Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death and Disease*, 2, e213;.
- D. Cervia*, a. G. (2013,). The Neuropeptide Systems and their Potential Role in the Treatment of Mammalian Retinal Ischemia: A Developing Story. *Current Neuropharmacology*, 11, 95-101.

- D. Cervia*, G. C. (2013,). The Neuropeptide Systems and their Potential Role in the Treatment of Mammalian Retinal Ischemia: A Developing Story. *Current Neuropharmacology*, 11, 95-101.
- David A. Antonetti, A. J. (2006). Seeing Beyond Glucose-Induced Microvascular Disease. *Diabetes*, 55:2401–2411, .
- Davide Cervia, E. C. (2012). Vascular endothelial growth factor in the ischemic retina and its regulation by somatostatin. *Journal of Neurochemistry*, 120: 818-829.
- Davide Cervia, G. C. (2008). Physiology and pathology of somatostatin in the mammalian retina:A current view-. *Molecular and Cellular Endocrinology* , 286: 112–122.
- DU, *. M. (2003). HYPERGLYCEMIA INCREASES MITOCHONDRIAL SUPEROXIDE IN RETINA. *Free Radical Biology & Medicine,Elsevier*, 35:1491–1499,.
- Durham JT, H. I. (2011.). Microvascular Modifications in Diabetic Retinopathy. *Current diabetes report*, 11:253-264.
- Elizabeth P. Rakoczy, I. S. (2010). Characterization of a Mouse Model of Hyperglycemia and Retinal Neovascularization. *The American Journal of Pathology*, , Vol. 177, No. 5, .
- ESTHER CARRASCO, B. C. (2007). Lower Somatostatin Expression Is an Early Event in Diabetic Retinopathy and Is Associated With Retinal Neurodegeneration. *Diabetes Care*, 30:2902–2908.
- FONG, M. M. (2004). Diabetic Retinopathy. *DIABETES CARE*, VOLUME 27, NUMBER 10.
- Foxton RH, F. A.-N. (2013;). VEGF-A is necessary and sufficient for retinal neuroprotection in models of experimental glaucoma. *Am J Pathol.* , 182(4):1379-90.
- Francesca Podesta`, *. G.-H. (2000,). Bax Is Increased in the Retina of Diabetic Subjects and Is Associated with Pericyte Apoptosis in Vivo and in Vitro. *Am J Pathol* , 156:1025–1032.
- Funatsu, H. Y. (2002). Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in. *Br J Ophthalmol*, 86:311–315.
- G. Casini, E. C. (2005). Functional aspects of the somatostatinergic system in the retina and the potential therapeutic role of somatostatin in retinal disease. *Histol Histopathol*, 20: 615-632.
- Gábríel, R. (2013). Neuropeptides and diabetic retinopathy. *British Journal of Clinical Pharmacology* © 2012 The British Pharmacological Society, 75:5 / 1189–1201.
- Gabriel, T. A. (2008). PACAP-Mediated Neuroprotection of Neurochemically Identified Cell Types in MSG-Induced Retinal Degeneration. *J Mol Neurosci* , 36:97–104.
- Gardner, S. F. (2014 April ;). Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment. *Ann N Y Acad Sci.* , 1311: 174–190.
- Gerasimos E Krassas, T. T. (2007). The efficacy of somatostatin analogues in the treatment of diabetic retinopathy and thyroid eye disease. *Clinical Ophthalmology* , 1(3) 209–215.
- Gomes E, P. L. (2007). The VEGFR2 and PKA pathways converge at MEK/ERK1/2 to promote survival in serum deprived neuronal cells. *Mol Cell Biochem.*, 305(1-2):179-90.

- Hans-Peter Hammes, *. H. (1995.). Nerve Growth Factor Prevents Both Neuroretinal Programmed Cell Death and Capillary Pathology in Experimental Diabetes. *Molecular Medicine*, V, 527-534.
- Hille W. van Dijk, P. H. (2009). Selective Loss of Inner Retinal Layer Thickness in Type 1 Diabetic Patients with Minimal Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2, ;50(7): 3404–3409.
- INOUCHI*, R. B. (1992). Preferential elevation of protein kinase C isoform 1311 and. *Medical Sciences*, Vol. 89, pp. 11059-11063.
- J M Lopes de Faria, H. R. (2002;). Retinal nerve fibre layer loss in patients with type 1 diabetes mellitus without retinopathy. *Br J Ophthalmol*, 86:725–728.
- J. Barber, *. E. (1998). Neural Apoptosis in the Retina during Experimental and Human Diabetes. *Jci*, 783–791.
- J. Middeldorp, E. H. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology* , 93: 421–443.
- Jianyan Hu, Q. W. (2013). Inhibition of high glucose-induced VEGF release in retinal ganglion cells by RNA interference targeting G protein-coupled receptor 91. . *Experimental Eye Research* , 109: 31 e 39.
- Jindal, V. (2015). Neurodegeneration as a Primary Change and Role of Neuroprotection in Diabetic Retinopathy. *Mol Neurobiol* , 51: 878–884.
- Joanna M. Tarr, K. K. (2013). *Pathophysiology of Diabetic Retinopathy*. Institute of Biomedical and Clinical Science, Peninsula College of Medicine and Dentistry, University of Exeter, St Luke's Campus,: Academic Editors: J. O. Croxatto, L. Pierro, G. Seigel, and I. J. Wang.
- Kern, T. S. (2008.). Retinal ganglion cells in diabetes. *J Physiol* 586., 18 pp 4401–4408.
- Kern, T. S. (2014;). Interrelationships between the Retinal Neuroglia and Vasculature in Diabetes. *Diabetes Metab J*, 38:163-170.
- Krisztina Szabadfi, E. P. (2014). Neuropeptides, Trophic Factors, and Other Substances Providing, Morphofunctional and Metabolic, Protection in Experimental Models, of Diabetic Retinopathy. *International Review of Cell and Molecular Biology, Elsevier Inc.*, Volume 311 1937-6448.
- Kumagai, K. (1999). Glucose Transport in Brain and Retina: Implications in the Management and Complications of Diabetes; *Diabetes Metab Res Rev* , 15: 261±273.
- Kun Lin Jin, X. O. (2000). Vascular endothelial growth factor: Direct neuroprotective effect in vitro ischemia . *PNAS*, vol. 97: 10242–10247 .
- Langmann1, T. (2007). Microglia activation in retinal degeneration. *Journal of Leukocyte Biology*, Volume 81: 1345-1351.
- Loske. (1998).
- M. SCOTT, J. F. (1986,). Vascular and neural changes in the rat optic nerve following induction of diabetes with streptozotocin. *J. Anat.*, 144, pp. 145-152.
- Magali Saint-Geniez, A. S. (2008). Endogenous VEGF Is Required for Visual Function: Evidence for a Survival Role on Muller Cells and Photoreceptors. *PLoS ONE*, volume 3.

- Marc Schmidt, A. G. (2003). How Does the Eye Breathe? *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, pp. 1932–1935.
- Marta Villarroel, A. C. (2010). Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy. *World J Diabetes*, 1(2): 57-64.
- MASAYOSHI TAKEUCHI, P. R. (2000). Neurotoxicity of Advanced Glycation End-Products for Cultured Cortical Neurons. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Vol. 59, pp.1094-1105.
- Mitsuo Kato, N. E. (2013). MicroRNAs: Potential Mediators and Biomarkers of Diabetic. *NIH Public Access*, 64: 85–94.
- Neville N. Osborne*, R. J. (2004). Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential. *Elsevier*, 91–147.
- Nicolàs Cuenca, L. F.-S. (2014). Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *ELSEVIER, Progress in Retinal and Eye Research*, xxx 1-59.
- Nyengaard, I. Y. (2004). Interactions Between Hyperglycemia and Hypoxia. *DIABETES*, VOL. 53,.
- Patrick H. Maxwell, P. J. (2002). Oxygen sensors and angiogenesis. *Elsevier Science*, Vol. 13, 2002: pp. 29–37.
- Presta, S. R. (2013). In vitro and ex vivo retina angiogenesis assays. *Springer Science*, 1-14.
- RandaS.Eshaq. (2014). oxygen delivery,consumption,and conversion to reactiveoxygen species in experimental models of diabetic retinopathy. *Elsevier RedoxBiology*, 2:61–666.
- RandaS.Eshaq. (2014). Oxygendelivery,consumption,andconversiontoreactiveoxygen. *ElsevierB.V*, 661–666.
- Remya Robinson, V. A. (2012). Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Disease Models & Mechanisms*, 5: 444-456.
- Simó, C. H. (2012). Neuroprotection in Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep*, 12:329–337.
- Stitt, A. W. (2001). Advanced glycation: an important pathological event in diabetic and age related ocular disease. *Br J Ophthalmol*, 85:746–753.
- Thermos, N. M. (2005). Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 371: 44–53.
- Timothy S. Kern1, 2. (2014). Interrelationships between the Retinal Neuroglia and Vasculature in Diabetes. *Diabetes Metab J*, 38:163-170.
- Tsubota, M. S. (2010). Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. *Diabetologia*, 53:971–979.
- Valeria Colafrancesco, M. C. (2011). Effect of eye NGF administration on two animal models of retinal ganglion cells degeneration. *. ann ist supeR sanità*, Vol. 47, 3: 284-289.
- Wiedemann, A. B. (2012;). Müller Glial Cells in Retinal Disease. *Ophthalmologica*, 227:1–19.

- Wilkinson-Berka. (2006). Angiotensin and diabetic retinopathy. *Elsevier. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38: 752–765.
- Will Whitmire, M. M.-G.-R. (2011;). Alteration of growth factors and neuronal death in diabetic retinopathy: what we have learned so far. *Molecular Vision*, 17:300-308.
- WOOD, R. J. (1996). RETINAL PROTEIN KINASE C. *Elsevier Science Ltd*, Vol. 30, No. 2, pp. 119 136.
- Xing Zhou, C.-F. S.-Y.-Q.-W.-M. (2014). Neuroprotective Effects of Methyl 3,4-dihydroxybenzoate Against H₂O₂-Induced Apoptosis in RGC-5 Cells . *J Pharmacol Sci* , 125, 51 – 58 .
- Ying-Jen Chen, Y.-S. H.-T.-H.-C.-L.-M. (2015;). Protective Effects of Glucosamine on Oxidative-Stress and Ischemia/Reperfusion-Induced Retinal Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 56:1506–1516.
- ZHAO-CHUN LIU1, E.-H. Y.-C. (2014). Translocation of protein kinase C δ contributes to the moderately high glucose-, but not hypoxia-induced proliferation in primary cultured human retinal endothelial cells. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*,9: 1780-1786.

